

Universidad Autónoma de Madrid

Departamento de Bioquímica



**CILASTATINA PROTEGE DEL
FRACASO RENAL AGUDO
INDUCIDO POR GENTAMICINA SIN
COMPROMETER SU EFICACIA
BACTERICIDA**

Juan Carlos Jado Rodríguez
Madrid, 2014

Universidad Autónoma de Madrid
Facultad de Medicina
Departamento de Bioquímica



**CILASTATINA PROTEGE DEL
FRACASO RENAL AGUDO
INDUCIDO POR GENTAMICINA SIN
COMPROMETER SU EFICACIA
BACTERICIDA**

Memoria presentada por D. Juan Carlos Jado Rodríguez, licenciado en Ciencias Químicas por la Universidad Complutense de Madrid, para optar al grado de Doctor, bajo la codirección del Dr. Alberto Tejedor Jorge y del Dr. Alberto Lázaro Fernández, realizada en la Unidad de Medicina y Cirugía Experimental del Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón, Hospital General Universitario Gregorio Marañón de Madrid.

Madrid, 2014



Hospital General Universitario
Gregorio Marañón
Comunidad de Madrid

Don Alberto Tejedor Jorge, Doctor en Medicina y
Don Alberto Lázaro Fernández, Doctor en Bioquímica, Biología Molecular y
Biomedicina,

CERTIFICAN

Que D. Juan Carlos Jado Rodríguez, Licenciado en Ciencias Químicas por la Universidad Complutense de Madrid, ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado “Cilastatina protege del fracaso renal agudo inducido por gentamicina sin comprometer su eficacia bactericida”, que presenta como tesis doctoral para obtener el grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid.

En Madrid a 22 de Abril de 2014.

Directores

Vº Bº del Tutor

Fdo. Dr. Alberto Tejedor Jorge

Fdo. Dr. Juan José Aragón Reyes

Fdo. Dr. Alberto Lázaro Fernández

“Sé tu mismo, el resto de papeles ya están cogidos”

Oscar Wilde

**“El trabajo único de la ciencia es hacer posible lo que se podría haber
considerado magia en el pasado”**

Anónimo

**“La ciencia se compone de errores, que a su vez, son los pasos hacia la
verdad”**

Julio Verne

**“Para las personas creyentes, Dios está al principio. Para los científicos está
al final de todas las reflexiones”**

Max Planck

A mis padres,
a mis hermanas y
especialmente a mi tío,
el mayor ejemplo de lucha, fuerza y positivismo que jamás haya conocido.

AGRADECIMIENTOS

Sé que todo el mundo lo dice, que parece un topicazo, pero creedme, llegar aquí, a escribir estas líneas, es el resultado final de un esfuerzo enorme que hubiera sido absolutamente imposible sin la ayuda y la confianza de muchas personas que están detrás de todo este trabajo. Desde luego es una satisfacción enorme poder centrarme ahora en los agradecimientos porque supone prácticamente la culminación de una etapa muy muy intensa de mi vida, de muchos buenos momentos pero, reconozcámoslo, también alguno que otro de agobio y frustración, porque las cosas requieren de mucho esfuerzo para que salgan finalmente bien. ¡Esto es ciencia! De modo que aquí van, de la mejor manera que sé, mis enormes agradecimientos a toda la gente que de una u otra manera forman parte de todo este trabajo.

En primer lugar quiero dar las gracias a la persona que confió en mí para llevar a cabo esta línea de investigación y que decidió incluirme en su equipo, el Dr. Alberto Tejedor, que siempre que recurrí a él, resolvió todas las dudas que me fueron surgiendo y me dio su punto de vista y consejos. Muchas gracias por dirigir mi tesis, Alberto. Por supuesto, quiero agradecer de una manera más que especial todo su apoyo, su dirección, su ayuda y absolutamente todo, desde un punto de vista científico pero también personal, a mi otro director de tesis, el Dr. Alberto Lázaro. Alberto, tío, es espectacular lo que me has ayudado, de verdad creo que todo lo que he aprendido a lo largo de estos años en mayor o menor medida ha sido gracias a ti. Estos últimos meses han sido un agobio, por muchos motivos, pero tu implicación, tu positivismo y en general, tu ayuda... han hecho que vea la luz al final del túnel. Muchas gracias por estar ahí siempre en lo personal cuando lo he necesitado, la verdad es que eres un amigo.

Quiero dar las gracias por encima de todo a las dos personas que me apoyan siempre en todo momento, sea cual sea el propósito que busco, lo haga bien o mal, me aconsejan y sobre todo, me quieren muchísimo, mis padres. Papá, mamá... mirad!!!! Lo he conseguido! Quien lo iba a decir!! Gracias a los dos, por ayudarme, por preocuparos por mí, por aguantarme en los momentos de agobios o de estrés por.... no sé, por básicamente todo, porque todos los logros que haya podido lograr en mi vida, habéis formado parte de ellos de una manera importantísima. Sois un apoyo espectacular. Laura, Lucía, hermanitas, gracias a las dos, por estar cuando os he necesitado y por vuestro apoyo. Os quiero un montón.

Al resto de mi familia, mi abuela Juanita y Conchita, una siempre atenta y pendiente de mis cosas, ofreciéndome su ayuda y preocupada por mi, tantas veces preguntándome como lo llevaba y si iba sacando las cosas adelante; la otra... no se qué pasará por su cabeza pero cuando se pone a reír ella sola, me encanta verla. Gracias a las dos. A Ascen, que la quiero un montón y que para mi es como mi hermana mayor y absolutamente siempre ha estado ahí para lo que sea que necesitase desde que tengo 6 añitos. Te quiero mucho! A mis primos y tíos, en especial a mi tío Javi, que hace unos pocos años me dio una buena lección de vida que no olvidaré y le quiero muchísimo. Donde quiera que estés, gracias tío.

Compis de labo, qué decir, he disfrutado un montón con vosotros, es genial lo bien que nos llevamos todos. Carol, creo que no te he visto enfadada ni una sola vez en el tiempo que he estado en el hospi, vaya alegría tienes siempre. Juanan y sus bromas de juegos de palabras tan ingeniosas, esos chistes “malos” que siempre son los más graciosos. Gracias por tus consejos personales y científicos; Marta, tu buen rollo y alegría; Inma, que por desgracia estabas en otro edificio y solo te veíamos en la hora de la comida, gracias por esperarnos siempre que llegábamos tarde y tus consejos cuando veníamos ofuscados del labo; Marina, qué decirte, tu personalidad única, qué buenos ratos hemos pasado contigo, lo muchísimo que me pude reír fumando de la pipa de la paz en Estambul, gracias por todo tu apoyo. Y en este apartado quisiera agradecer especialmente a mi compi de nefro, Blanca. Blanki, lo primero de todo, enhorabuena, se abre lo que me imagino es la etapa más bonita de la vida ahora con Valeria. Cuanto me has apoyado en el labo, siempre dispuesta a ayudarme y vaya primeros meses, si no llegas a estar ahí, no se que hubiera sido de mi. Eres una amiga y una compañera genial.

Gracias a Enrique Lledó por haberme ayudado en este tramo final cuando ya me veía con el agua al cuello; a Ricardo Bosch que gracias a él contacté con Alberto; y a Lisardo Boscá y todo su grupo (María, Maripi, Luis, Omar, Mariajo, Vero y Gema) que me acogieron durante el verano de 2013. Siempre se agradece. Gracias a Gema también, por ayudarme de manera desinteresada con mi mayor enemigo al escribir la tesis, el ordenador. Ahora quedará mucho mejor. Y por último al resto de compañeros del Pabellón de Medicina y Cirugía Experimental (Laura, Mariví, Javi Vaquero, Javi veterinario, Rafa, Mercedes, Natalia, Juan, Pancho, Charo, Rosa, María...) Cada uno en lo vuestro, habéis puesto vuestro granito de arena.

Para terminar, quiero agradecer todo su apoyo a mis amigos. Kike, Hugo, madre mía... siguen pasando los años y ya son 25 y seguís estando ahí y por lo que veo aun nos queda lo nuestro. Ahora mismo a cual más lejos, uno en Girona y el otro en Filipinas, se os echa de menos pero os he tenido para todo siempre. Gracias chavales, ya sabéis que sois mis mejores amigos. Illo!!! Ese cordobés! Ángel, tu no te quedas tampoco atrás. Has sido todo un apoyo y un buen amigo en un momento complicado y gracias a tu buen rollo, ayuda y amistad se han abierto muchas puertas. Espero que nuestros piques tenísticos se repitan durante mucho tiempo. No lo digo muy a menudo a la gente, pero eres un amigo. Fer, vaya energía positiva, capacidad de convocatoria y de reunir gente, se nota un montón tu ausencia, se que estás genial en Toulouse, pero vente otra vez para acá. Ojalá se me pegaran muchas más cosas de ti. Al resto de mis amigos y compañeros de fiesta y esquí, Raulillo, Chemi, Mojo, Miguel, Lolo, Nuria, Chupix, Nya, Rubén, Carlos, Guillaume... he encontrado en vosotros un gran grupo de amigos. A todos, gracias.

Juancar...

Gentamicina es el antibiótico aminoglucósido más utilizado en la clínica humana para el tratamiento de infecciones producidas por bacterias Gram-negativas. Sin embargo su principal inconveniente reside en su elevada nefrotoxicidad, limitando en ocasiones su uso clínico. Durante el desarrollo de esta tesis, hemos demostrado el efecto protector de cilastatina, un ligando inhibidor de la enzima dehidropeptidasa renal I (DHP-I, localizada en el borde en cepillo de las células tubulares proximales) en la toxicidad renal inducida por gentamicina.

Los estudios *in vitro* realizados en cultivos primarios de células tubulares han mostrado que cilastatina es capaz de protegerlos de la muerte inducida por gentamicina así como preservar su morfología y funcionalidad. La eficacia terapéutica de cilastatina ha sido posteriormente confirmada mediante la realización de un modelo *in vivo* de fracaso renal agudo inducido por gentamicina en ratas. Los animales que fueron tratados con gentamicina y cilastatina mostraron una mejor función renal, una disminución significativa del estrés oxidativo, de los procesos inflamatorios y de la activación de los mecanismos implicados en los procesos de muerte celular con respecto a los animales que únicamente fueron tratados con gentamicina. Asimismo, hay una menor acumulación del tóxico en el interior celular, apuntando a que cilastatina actúa como protector renal frente a la nefrotoxicidad de gentamicina por la interacción que genera con su principal transportador, megalina, en las balsas de colesterol presentes en el borde en cepillo de la membrana plasmática de las células. Por otro lado, hemos demostrado que cilastatina no ejerce ningún efecto en la función bactericida de gentamicina al estudiarse su posible interacción con sus dianas terapéuticas bacterianas. Por ello, la protección renal de cilastatina es órgano-específica, lo que la convierte en una alternativa terapéutica muy prometedora para la prevención del fracaso renal agudo causada por gentamicina.

Abstract

Gentamicin is the most widely used aminoglycoside antibiotic to treat many types of bacterial infections, particularly those caused by Gram-negative organisms. Nevertheless, nephrotoxicity remains as its major limitation during the clinical use. In the current thesis, we have demonstrated nephroprotection by cilastatin (a dehydropeptidase-I renal enzyme competitive inhibitor located in the proximal tubule epithelial cells brush border) in a gentamicin-induced renal toxicity.

In vitro assays in cultured primary renal proximal tubular epithelial cells have shown that cilastatin is able to protect them from gentamicin-induced cell death as well as to preserve their morphology and functionality. Cilastatin therapeutic efficiency was then proven *in vivo* by performing a gentamicin-induced acute renal injury *in vivo* model in rats. Gentamicin and cilastatin-treated animals showed a better renal function. In addition, we observed a reduction in oxidative stress and inflammatory responses and the activation of proteins that play a key role in cell death mechanisms in comparison with those treated with gentamicin only. Moreover, cilastatin is capable to partially reduce gentamicin entry and intracellular accumulation decreasing its nephrotoxicity caused by the interaction with its most important transporter, megalin onto the lipid rafts. We also demonstrate that cilastatin does not interfere in gentamicin antibiotic capacity when studying its possible interaction with their therapeutic targets. Thus, cilastatin renal protection seems to be kidney-specific turning the drug into a very promising therapeutic tool in the prevention of gentamicin-induced acute renal failure.

ÍNDICE

| | |
|---|-----------|
| I.- ABREVIATURAS..... | 1 |
| II.- INTRODUCCIÓN | 5 |
| 1.- El riñón y el túbulo proximal renal | 6 |
| 1.1.- El riñón..... | 6 |
| 1.1.1.- El túbulo proximal | 8 |
| 1.2.- El fracaso renal..... | 9 |
| 1.2.1.- Fracaso renal crónico | 9 |
| 1.2.2.- Fracaso renal agudo | 9 |
| 1.2.2.1- Fracaso renal agudo tóxico..... | 10 |
| 1.3.- Procesos celulares involucrados en el daño renal | 12 |
| 1.3.1.- Muerte celular | 13 |
| 1.3.2.- Estrés oxidativo | 16 |
| 1.3.3.- Inflamación y fibrosis | 16 |
| 2.- Gentamicina y su efecto nefrotóxico..... | 18 |
| 2.1.- Aminoglucósidos | 18 |
| 2.2.- Gentamicina | 19 |
| 2.2.1.- Nefrotoxicidad: Mecanismos de acción de gentamicina en el túbulo proximal | 19 |
| 3.- Cilastatina y su efecto nefroprotector | 22 |
| 3.1.- Perspectiva histórica. Imipenem-cilastatina | 22 |
| 3.1.1.- Imipenem..... | 22 |
| 3.1.2.- Cilastatina, estructura y función..... | 23 |
| 3.2.- Dehidropeptidasa renal I..... | 24 |
| 3.3.- Balsas de colesterol | 24 |
| 3.4.- Evidencias de nefroprotección por cilastatina..... | 25 |
| 3.4.1.- Interacción con ciclosporina | 25 |
| 3.4.2.- Interacción con vancomicina | 25 |
| 3.4.3.- Interacción con cisplatino | 25 |
| III.- HIPÓTESIS..... | 26 |
| IV.- OBJETIVOS..... | 28 |
| V.- MATERIALES Y MÉTODOS..... | 30 |
| V.I.- EXPERIMENTOS <i>IN VITRO</i>..... | 31 |
| 1.- Fármacos en estudio | 32 |
| 1.1.- Gentamicina | 32 |
| 1.2.- Cilastatina | 32 |
| 2.- Cultivos celulares | 32 |
| 2.1.- Células renales | 32 |
| 2.1.1.- Aislamiento de túbulos proximales..... | 33 |
| 2.1.2.- Cultivo Primario de Células de Túbulo Proximal | 34 |
| 2.1.3.- Cultivo Secundario de Células de Túbulo Proximal | 35 |
| 3.- Estudio de muerte celular | 35 |
| 3.1.- Morfología celular y nuclear..... | 35 |
| 3.2.- Citometría de flujo | 36 |

| | |
|---|----|
| 3.3.- Enriquecimiento nucleosomal..... | 36 |
| 3.4.- Determinación de la liberación de lactato deshidrogenasa | 37 |
| 4.- Estudios de viabilidad celular..... | 37 |
| 5.- Estudios de acumulación intracelular de gentamicina | 37 |
| 6.- Experimentos en bacterias. Pruebas de sensibilidad bacteriana | 38 |
| 7.- Análisis estadístico | 40 |
| V.II.- EXPERIMENTOS <i>IN VIVO</i> | 42 |
| 1.- Modelo de fracaso renal agudo por gentamicina | 43 |
| 2.- Extracción, procesamiento y almacenaje de muestras | 44 |
| 3.- Medida de la proteinuria | 45 |
| 4.- Determinación de parámetros bioquímicos en suero y orina | 45 |
| 5.- Estudios histopatológicos..... | 47 |
| 6.- Determinación de la fibrosis tubular | 47 |
| 7.- Inmunohistoquímica..... | 48 |
| 8.- Extracción de proteínas totales..... | 49 |
| 9.- Western Blot | 49 |
| 10.- Determinación de proteínas en suero y orina | 51 |
| 11.- Ensayo de TUNEL | 51 |
| 12.- Extracción de ARN total de corteza renal | 52 |
| 13.- PCR en tiempo real | 53 |
| 14.- Determinación de la capacidad antioxidante | 53 |
| 15.- Determinación del factor de necrosis tumoral α | 54 |
| 16.- Acumulación de gentamicina en tejido renal..... | 54 |
| 17.- Análisis estadístico..... | 54 |
| VI.- RESULTADOS | 56 |
| VII.- RESULTADOS MODELO <i>IN VITRO</i> | 57 |
| 1.- La cilastatina como agente nefroprotector | 58 |
| 1.1.- Estudios en la dinámica de crecimiento celular | 58 |
| 2.- Efecto de gentamicina. Acción de cilastatina | 59 |
| 2.1.- Morfología celular..... | 59 |
| 2.2.- Medidas de muerte celular por apoptosis | 60 |
| 2.2.1.- Efecto de cilastatina sobre la aparición de alteraciones nucleares..... | 60 |
| 2.2.2.- Efecto de cilastatina en el enriquecimiento nucleosomal | 61 |
| 2.3.- Efecto de cilastatina en la viabilidad celular | 62 |
| 2.4.- Medida de muerte celular por necrosis..... | 63 |
| 2.5.- Efecto de cilastatina en la acumulación intracelular de gentamicina | 64 |
| VII.II.- RESULTADOS MODELO <i>IN VIVO</i> | 66 |

| | |
|---|------------|
| 1.- Modelo animal de fracaso renal agudo inducido por gentamicina. | |
| Protección con cilastatina..... | 67 |
| 1.1.- Cilastatina disminuye la pérdida de peso corporal | 67 |
| 1.2.- Cilastatina recupera la función renal | 68 |
| 1.2.1.- Parámetros bioquímicos en sangre..... | 68 |
| 1.2.2.- Parámetros bioquímicos en orina..... | 69 |
| 1.2.3.- Parámetros bioquímicos estimados de la función renal | 71 |
| 1.2.4.- Cilastatina reduce la expresión de KIM-1 | 71 |
| 1.2.5.- Estudio de la morfología renal | 73 |
| 1.2.5.1- Morfología cortical | 73 |
| 1.2.5.2- Morfología medular | 74 |
| 1.2.5.3- Puntuación o “score” de daño renal..... | 75 |
| 1.3.- Efecto de cilastatina sobre la apoptosis..... | 76 |
| 1.3.1.- Cilastatina impide la aparición de caspasa-9 | 76 |
| 1.3.2.- Cilastatina impide la aparición de caspasa-3 | 77 |
| 1.3.3.- Cilastatina reduce la aparición de Bax pero no de Bcl-2 | 79 |
| 1.3.4.- Cilastatina impide la activación de la ruta Fas/Fas-L..... | 81 |
| 1.3.5.- Cilastatina no modifica los niveles de caspasa-8 activa | 83 |
| 1.3.6.- Cilastatina impide la fragmentación del ADN | 83 |
| 1.4.- Efecto de cilastatina sobre el estrés oxidativo | 84 |
| 1.4.1.- Cilastatina recupera la capacidad antioxidante | 84 |
| 1.4.2.- Cilastatina impide la disminución de los niveles de Cu/Zn superóxido dismutasa..... | 85 |
| 1.4.3.- Cilastatina impide la disminución de los niveles de catalasa..... | 86 |
| 1.4.4.- Cilastatina impide el aumento de HSP-27 | 87 |
| 1.4.5.- Cilastatina impide el descenso de HSP-70 | 88 |
| 1.4.6.- Cilastatina reduce la peroxidación lipídica. Disminución de la aparición de 4-hidroxi-2-nonenal..... | 88 |
| 1.5.- Efecto de cilastatina en la respuesta inflamatoria y fibrótica..... | 89 |
| 1.5.1.- Cilastatina disminuye la síntesis de $TNF\alpha$ | 89 |
| 1.5.2.- Cilastatina reduce la presencia de monocito/macrófago | 90 |
| 1.5.3.- Efecto de cilastatina sobre citoquinas proinflamatorias | 91 |
| 1.5.4.- Cilastatina disminuye la producción de VCAM-1 | 93 |
| 1.5.5.- Efecto de cilastatina sobre la formación de fibrosis | 94 |
| 1.5.6.- Cilastatina inhibe la síntesis de $TGF\beta$ | 95 |
| 1.5.7.- Cilastatina disminuye la producción de CTGF | 97 |
| 1.6.- Efecto de cilastatina sobre la acumulación de gentamicina a nivel renal.... | 99 |
| 1.6.1.- Efecto de cilastatina sobre la entrada de gentamicina | 99 |
| 1.6.2.- Efecto de cilastatina sobre el transportador de gentamicina: megalina..... | 99 |
| VI.III.- RESULTADOS EXPERIMENTOS EN BACTERIAS..... | 102 |
| 1.- Efecto de cilastatina sobre la capacidad bactericida de gentamicina | 103 |
| VII.- DISCUSIÓN | 107 |
| 1.- Gentamicina como antibiótico y nefrotóxico. Efecto de cilastatina .. | 108 |
| 2.- Apoptosis, necrosis y daño renal. Efecto de cilastatina..... | 111 |
| 3.- Estrés oxidativo. Efecto de cilastatina..... | 114 |
| 4.- Inflamación y fibrosis. Efecto de cilastatina..... | 116 |
| 5.- Expresión génica. Efecto de cilastatina | 117 |

| | |
|--|-----|
| 6.- Efecto de cilastatina sobre el transporte celular de gentamicina. ¿Mecanismo de protección? | 118 |
| 7.- Cilastatina: un gran candidato para el tratamiento en la nefrotoxicidad por gentamicina | 121 |
| VIII.- CONCLUSIONES | 123 |
| IX.- BIBLIOGRAFÍA..... | 125 |
| X.- ANEXO | 139 |

I.- ABREVIATURAS

| Abreviaturas | Definición |
|------------------------|--|
| A | Adenina |
| ABC | ATP-binding cassette |
| ADN | Ácido desoxirribonucleico |
| ADNc | ADN copia |
| AG | Aminoglucósidos |
| AINE | Antiinflamatorio no esteroideo |
| ANOVA | Análisis de la varianza |
| Apaf-1 | Apoptosis Protease-Activating Factor-1 |
| APES | 3-aminopropil-trietoxisilano |
| ARN | Ácido ribonucleico |
| ARNm | ARN mensajero |
| ATP | Adenosin trifosfato |
| BCA | Ácido bicinconínico |
| BDC | Balsas de colesterol |
| BSA | Albúmina sérica bovina |
| C | Citosina |
| CaSR | Receptores sensibles a calcio extracelular |
| Cil | Cilastatina |
| CIP | Cóctel de inhibidor de proteasas |
| CICI | Aclaramiento de cloro |
| CH₂O | Aclaramiento de agua libre |
| CMB | Concentración mínima bactericida |
| CMI | Concentración mínima inhibitoria |
| CsA | Ciclosporina A |
| CTGF | Factor de crecimiento de tejido conectivo |
| DAB | 3-3'-diamino-bencidina |
| DAPI | Diclorohidrato de 4'6-diamidino-2-fenilindol |
| DEPC | Dietilpirocarbonato |
| DHP-I | Dehidropeptidasa I |

| | |
|-----------------------------------|---|
| DMSO | Dimetil-sulfóxido |
| DPX | Dibutilftalato |
| ECL | Activación de la quimioluminiscencia |
| EDTA | Ácido etilendiaminotetraacético |
| EEM | Error estándar de la media |
| EFH₂O | Excreción fraccional de agua |
| EFNa⁺ | Excreción fraccional de sodio |
| EGF | Factor de crecimiento epidérmico |
| EGTA | Ácido etilen-glicol-tetraacético |
| ELISA | Enzyme-linked immunosorbent assay |
| EO | Estrés oxidativo |
| FADD | Fas-associated death domain |
| Fas-L | Ligando de Fas |
| FG | Filtrado glomerular |
| FRA | Fracaso renal agudo |
| FRC | Fracaso renal crónico |
| FSR | Flujo sanguíneo renal |
| G | Guanina |
| GAPDH | Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa |
| GPI | Glicosil-fosfatidil-inositol |
| H₂O₂ | Peróxido de hidrógeno |
| HEPES | Ácido N-[2-hidroxietyl]piperazina-N'-[2-etanosulfónico] |
| HGUGM | Hospital General Universitario Gregorio Marañón |
| 4-HNE | 4-hidroxí-2-nonenal |
| HSP | Proteína de shock térmico |
| HTA | Hipertensión arterial |
| I/C | Imipenem/ Cilastatina |
| IFN | Interferón |
| IGF-1 | Factor de crecimiento similar a la insulina |
| IL | Interleuquina |

| | |
|----------------------------------|--|
| i.m. | Intramuscular |
| i.p. | Intraperitoneal |
| IRC | Insuficiencia renal crónica |
| ITDA | Instituto Tecnológico de Desarrollo Agropecuario |
| i.v. | Intravenoso |
| IκB | Inhibidor del factor nuclear κB |
| KIM-1 | Kidney Injury Molecule 1 |
| K_f | Coefficiente de ultrafiltración |
| LDH | Lactato deshidrogenasa |
| LDL | Lipoproteínas de baja densidad |
| LDLR | Receptores de LDL |
| LSD | Least significant difference |
| MCP-1 | Proteína quimioatrayente de monocitos-1 |
| MRP | Multidrug Resistance-associated Protein |
| NADH | Dinucleótido de adenina nicotinamida |
| NFκB | Factor nuclear κB |
| NAG | N-acetil-beta-D-glucosaminidasa |
| NO | Óxido nítrico |
| NP-40 | Octil fenoxipolietoxietanol |
| NTA | Necrosis tubular aguda |
| NTIA | Nefritis túbulo-intersticial aguda |
| NUS | Nitrógeno ureico en sangre |
| ¹O₂ | Oxígeno singlete |
| O₂[·] | Radical superóxido |
| OAT | Transportadores de aniones orgánicos |
| OATP | Polipéptido transportador de aniones orgánicos |
| OCT | Transportadores de cationes orgánicos |
| OH[·] | Radical hidroxilo |
| ONOO[·] | Peroxinitrito |
| P | Presión neta de ultrafiltración |

| | |
|------------------------|---|
| PAF | Platelet-activating factor |
| PBS | Tampón fosfato salino |
| PBST | PBS Tween-20 |
| PCR | Reacción en cadena de la polimerasa |
| PGE₂ | Prostaglandina E ₂ |
| PgP | P-glicoproteínas |
| PMSF | Fluoruro de fenilmetilsulfonilo |
| PTEC | Células epiteliales del túbulo proximal |
| RE | Retículo endoplasmático |
| ROS | Especies reactivas de oxígeno |
| rpm | Revoluciones por minuto |
| SB | Sobrenadante |
| SBF | Suero bovino fetal |
| SDS | Dodecil sulfato sódico |
| SFN | Sulforafeno |
| SOD | Superóxido dismutasa |
| T | Timina |
| tBid | Forma truncada de Bid |
| TFG | Tasa de filtración glomerular |
| TBS | Tampón Tris salino |
| TBST | TBS Tween-20 |
| TGFβ | Factor de crecimiento transformante β |
| TNFα | Factor de necrosis tumoral alfa |
| TNFR | Receptor del factor de necrosis tumoral |
| TRAIL | Ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF |
| TUNEL | Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated DUTP Nick end labeling |
| u.a.d. | Unidades arbitrarias de densitometrado |
| UPR | Respuesta de proteínas no plegadas |
| VCAM-1 | Vascular cell adhesion molecule-1 |

II.- INTRODUCCIÓN

1.- El riñón y el túbulo proximal renal

1.1.- El riñón

Los riñones son órganos excretores situados en el retroperitoneo, en la parte posterior del abdomen, a ambos lados de la columna vertebral. Se ubican entre la última vértebra torácica y las tres primeras vértebras lumbares estando protegidos parcialmente por las costillas 11 y 12 y rodeados por dos capas de grasa peri-renal y para-renal que también ayudan a protegerlos. Presentan forma de habichuela y un diámetro de 12 a 13 cm de largo y de 6 a 8 cm de ancho con un peso de 120 a 160 gramos. Las funciones principales del riñón son:

- *Función excretora y de reabsorción.* La excreción se realiza a través de la orina por la cual se eliminan los productos de desecho del metabolismo como la urea o creatinina.
- *Función reguladora del medio interno (homeostasis).*
 - Regulan el balance de sodio y agua así como el de otras sales como potasio, fósforo, calcio o magnesio entre otras, ajustando las salidas a las entradas.
 - Regulación ácido-base. Eliminan los productos ácidos (hidrogeniones) formados en la descomposición de los nutrientes.
 - Regulación de la presión arterial a través del sistema renina-angiotensina.
- *Función endocrina.* El riñón secreta y degrada una serie de hormonas con distintas funcionalidades:
 - Secreción de eritropoyetina, responsable de estimular la producción de glóbulos rojos.
 - Activación de la vitamina D, permitiendo la absorción de calcio y fósforo en el intestino necesarios para la mineralización de los huesos.

Cada riñón está formado por aproximadamente un millón de nefronas que son su unidad fundamental tanto estructural como funcional. Estas nefronas actúan como filtros de la sangre para regular el agua y sustancias solubles, reabsorbiendo las sustancias útiles que son devueltas a la sangre para su reutilización y excretando el resto en forma de orina. Cada unidad está formada por (Figura 1):

- Glomérulo o corpúsculo de Malpighi. Estructura esférica, componente de la filtración inicial de la nefrona, formada a su vez por:
 - Cápsula de Bowman. Unidad renal en forma de esfera hueca localizada al comienzo del componente tubular de una nefrona. Encerrado dentro de ella se encuentra el ovillo capilar del glomérulo.

- Ovillo capilar. Unidad anatómica funcional del riñón donde radica la función de aclaramiento y filtrado de plasma sanguíneo.
- Túbulo proximal. Reabsorbe el 80% del ultrafiltrado. Muchos tóxicos que atraviesan su luz tubular pueden lesionar este segmento a su paso transcelular.
- Asa de Henle. Estructura en forma de U (rama ascendente y descendente). Conduce desde el túbulo contorneado proximal hasta el túbulo contorneado distal. Construye el gradiente osmótico medular a expensas del bombeo activo de Na^+ .
- Túbulo distal. Encargado de ajustar mediante secreción tubular los balances finales de calcio, sodio, potasio y protones, es decir, el proceso por el cual los desechos y sustancias en exceso que no fueron filtrados inicialmente son eliminados de la sangre para su excreción.
- Túbulo colector. Último segmento de la nefrona. Sensible a la precipitación o cristalización de fármacos de baja solubilidad a pH ácidos, ya que es donde se lleva a cabo la reabsorción final de agua y la concentración máxima de orina.

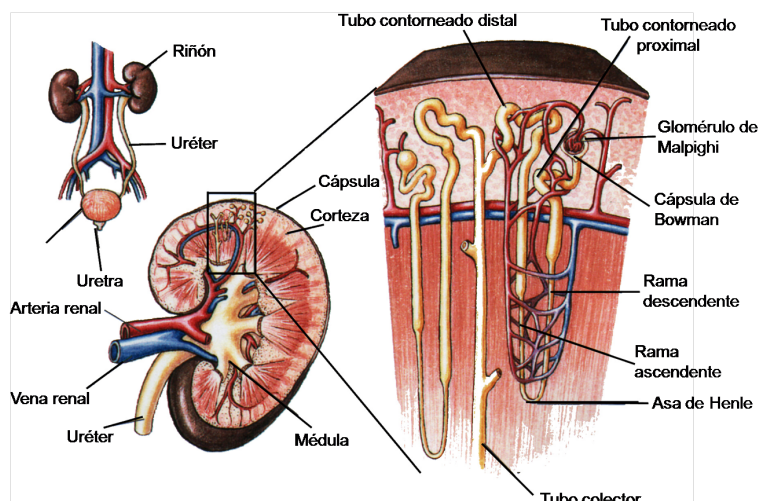


FIGURA 1. Fisiología renal. A la izquierda, corte esquemático de la topología general renal. A la derecha, localización cortical y medular de los componentes de la nefrona y del sistema de los conductos colectores.

*Imagen obtenida de <http://docentes.educacion.navarra.es/metayosa/1bach/1nutriani13.html>

En la zona cortical se encuentran tanto los glomérulos como los túbulos proximales y distales mientras que en la zona medular se localizan las ramas ascendentes y descendentes del asa de Henle y los túbulos colectores.

En el glomérulo se lleva a cabo el aclaramiento y filtración del plasma sanguíneo. Está constituido por una red de vasos capilares originados a partir de la arteriola aferente que recibe la sangre proveniente de la circulación renal. Después de que la

sangre se filtre para formar la orina primitiva, la sangre remanente sale del glomérulo por una arteriola eferente hacia la cápsula de Bowman.

Los glomérulos filtran en el ser humano 180 litros de plasma al día, es decir, los 3 litros de plasma de la sangre pasan por los filtros renales 60 veces al cabo del día. Sin embargo, solo el 1% del plasma filtrado será finalmente excretado en forma de orina, por lo que el túbulo renal deberá de extraer y reabsorber la mayor parte del agua, glucosa, fosfatos, aminoácidos, bicarbonato y albúmina. Este proceso generará la orina definitiva ajustando su volumen y concentración al volumen y composición de la ingesta.

1.1.1.- El túbulo proximal

Los túbulos renales proximales se originan en el polo urinario de los glomérulos, localizados en la corteza y entrando en la médula para continuar en la rama descendente del asa de Henle. Sus paredes se componen de una sola capa de células cúbicas (células epiteliales del túbulo proximal (PTEC)) en cuyo lado luminal se localizan unas microvellosidades denominadas *borde en cepillo*, estructura que provoca un aumento importante en la superficie de absorción y que por tanto, dota al túbulo proximal de su principal función; la reabsorción. El túbulo proximal reabsorbe entre el 40-60% del ultrafiltrado glomerular que contiene principalmente aminoácidos, glucosa (reabsorbidos prácticamente en su totalidad), urea, bicarbonato, fosfatos agua e iones que en su recorrido irá formando la orina.

La capacidad de reabsorción del túbulo proximal es muy elevada ya que de los 180 litros filtrados al día, el 80-85% (alrededor de 150 litros) vuelven a la circulación. La concentración de algunas sustancias (ácido hipúrico, urocromo o algunos fosfatos) es superior en el líquido del asa de Henle que el ultrafiltrado glomerular, a pesar de que la reabsorción en el túbulo proximal se efectúa en forma isoosmolar con el ultrafiltrado. Este hecho revela que el túbulo proximal es no sólo capaz de reabsorber, sino que tiene también capacidad excretora.

Además, las PTEC también realizan función secretora mediante transportadores localizados en su cara basolateral y apical. Los transportadores de la cara basolateral se caracterizan por ser más inespecíficos como los de las familias de transportadores de aniones orgánicos (OAT) y cationes orgánicos (OCT), así como la familia del polipéptido transportador de aniones orgánicos (OATP). Por el contrario, en la cara luminal se localizan OAT y transportadores de $\text{Na}^+/\text{PO}_4^{3-}$ tipo 1, el transportador de péptidos PEPT y mecanismos de transporte activo basados en P-glicoproteínas (PgP) de los tipos MRP (*Multidrug Resistance-associated Protein*) y MDR1 de la superfamilia ABC (*ATP-binding cassette*) especializados en el bombeo de sustancias tóxicas hacia la luz tubular⁹.

Estos mecanismos de transporte hacen que el túbulo proximal sea especialmente

susceptible al daño tóxico y por tanto que los principales fármacos nefrotóxicos ejerzan aquí su actividad.

1.2.- El fracaso renal

Existen diferentes tipos de nefropatías en función del segmento del riñón principalmente afectado (vasculares, glomerulares, tubulointersticiales). Siempre que se produce un daño renal, se produce cambio en el número de células que viene regulado a través de un balance entre mitosis y muerte celular^{125,128}, interviniendo en ocasiones procesos de migración celular o transdiferenciación celular. Una ruptura del equilibrio entre estos procesos puede dar lugar a desórdenes en el número de células, ya sea por exceso (neoplasia o glomerulonefritis proliferativa) o por defecto (atrofia renal).

Independientemente del tipo de nefropatía, la principal consecuencia del daño renal es el fracaso en las funciones del riñón pudiendo incluso causar la muerte. Una pérdida brusca de la función renal como resultado de lesión isquémica, oxidativa, inflamatoria o tóxica da lugar al fracaso renal agudo. Sin embargo la mayoría de las nefropatías destruyen nefronas de una manera lenta y silenciosa reduciendo el número de nefronas funcionales, lo que da lugar al fracaso renal crónico.

1.2.1.- Fracaso renal crónico

El fracaso renal crónico (FRC) o insuficiencia renal crónica (IRC) es la pérdida lenta, progresiva e irreversible de la función de los riñones con el tiempo (a partir de 3 meses) cuyo grado de afección se determina por el filtrado glomerular (FG) $< 60\text{ml/min./1.73m}$, existiendo hasta 5 estadios diferentes¹²⁸.

1.2.2.- Fracaso renal agudo

El fracaso renal agudo (FRA) se define como un síndrome caracterizado por la caída brusca del FG en días o semanas, expresándose clínicamente como la incapacidad de excretar los productos nitrogenados de desecho y regular la homeostasis de líquidos y electrolitos en el que se ponen de manifiesto factores vasculares/glomerulares y tubulares. Tras un período de disfunción renal variable (1-3 semanas) el proceso suele revertir⁶⁶. Las células tubulares que permanecen en los túbulos proliferan para regenerar el epitelio tubular recuperando la función renal. Este proceso es dependiente de la proliferación de factores de crecimiento, como el factor de crecimiento epidérmico (EGF) o el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-1)⁶⁶. Tras pasar 3 meses, si el proceso no ha revertido se considera la evolución de FRA a FRC. En el FRA se producen cambios morfológicos como consecuencia de la muerte celular, inflamación, atrofia tubular, pérdida del borde del cepillo, generación de edema intersticial, etc.

Desde el punto de vista fisiopatológico, el FRA se clasifica según indica la Tabla 1:

| TIPOS DE FRA | DESCRIPCIÓN | CAUSAS |
|---------------------------------|--|---|
| Pre-renal o funcional | Disminución de la perfusión sanguínea renal con presión glomerular capilar disminuida y menor depuración renal | - AINE Inhibición de mecanismo vasodilatador de PGE_2 en arteriola aferente. |
| | | - Anticalcineurínicos Vasoconstricción arteriolas aferente y eferente. |
| | | - Diuréticos Depleción de volumen. |
| | | - Hipoalbuminemia, hemorragias |
| Renal o parenquimatoso | Daño en las estructuras anatómicas renales | - Vascular Vasculitis, HTA maligna, oclusión de vasos. |
| | | - Glomerular Glomerulonefritis. |
| | | - Intersticial NTIA: Antibióticos, antivirales, diuréticos, antifúngicos, etc. |
| | | Infiltración tumoral. |
| | | Isquémica. |
| | | - NTA Tóxica Exógenos: Antibióticos, antivirales, antifúngicos, contrastes radiológicos, inmunosupresores y antineoplásicos, etc. Endógenos: Pigmentos, proteínas. |
| Post-renal u obstructivo | Obstrucción de la vía urinaria | Urológica/ginecológica, neoplasias, fibrosis retroperitoneal. |

TABLA 1. Tipos y causas del FRA. AINE: antiinflamatorios no esteroideos; PGE_2 : prostaglandina E2; HTA: hipertensión arterial; NTIA: nefritis túbulo-intersticial aguda; NTA: necrosis tubular aguda.

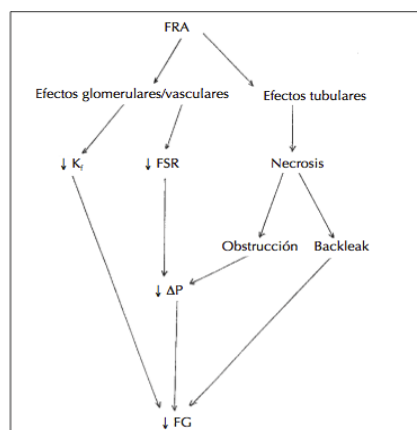
1.2.2.1- Fracaso renal agudo tóxico

Se le llama FRA tóxico a aquel producido como consecuencia de sustancias nefrotóxicas. El desarrollo de nuevos y potentes fármacos supone un avance importante en el tratamiento de enfermedades pero también pueden ser la causa de una elevada mortalidad y morbilidad por la toxicidad que producen. La consecuencia de la toxicidad renal de estos fármacos y de otros agente tóxicos como sales de metales pesados, hidrocarburos, toxinas vegetales o bacterianas es la aparición de un FRA.

Los efectos glomerulares de una sustancia nefrotóxica se manifiestan con una disminución del coeficiente de ultrafiltración (K_f) (provocado por alteraciones en la permeabilidad hidráulica de la barrera de filtración o por la activación de contracción y proliferación de células mesangiales intraglomerulares). Las nefrotoxinas actúan sobre los vasos sanguíneos produciendo una disminución del flujo sanguíneo renal (FSR). En el túbulo, la nefrotoxina provoca necrosis celular por distintos mecanismos produciendo una obstrucción tubular y un “backleak” o escape de líquido desde la luz tubular. El descenso de la presión efectiva de ultrafiltración, la disminución del K_f y el “backleak”

del líquido tubular producen como resultado final una disminución en la tasa de filtración glomerular (TFG) (Figura 2).

Por otro lado, los solutos no reabsorbidos en los segmentos proximales aumentarán la carga distal en una estructura celular especializada conocida como mácula densa. Esta acumulación provocará un aumento en la concentración de adenosina local, reduciendo el FG mediante la vasoconstricción de la arteriola aferente dependiente de receptores de



adenosina A-1 localizados en la misma. El marcador más característico del daño es el incremento de las concentraciones séricas de creatinina y urea.

FIGURA 2. Mecanismos que llevan a la disminución del filtrado glomerular durante el daño renal. K_f: coeficiente de ultrafiltración; FSR: flujo sanguíneo renal; P: presión neta de ultrafiltración; FG: filtración glomerular. *Imagen obtenida de Rivas-Cabañero, L.¹³⁰.

Los fármacos nefrotóxicos más importantes (Tabla 2) ejercen además sus efectos sobre el túbulo proximal dependiendo su actividad tóxica de la dosis, pauta de administración y otros parámetros farmacocinéticos que determinan la concentración del principio activo en el tejido diana y la susceptibilidad relativa de las células que puede verse aumentada cuando se encuentran expuestas a determinadas condiciones fisiopatológicas o patológicas (Tabla 2).

| GRUPO | SUSTANCIA NEFROTÓXICA |
|--------------------|--|
| Fármacos | Antibióticos, antivirales y antifúngicos: penicilina, aminoglucósidos (gentamicina)... Contrastes iodados: iopamidol, amidotrizoato, ioxagato, iobitridol, diatrizoato... Antineoplásicos: cisplatino, carboplatino, ciclofosfamida, fluorouracilo... Diuréticos: furosemida, torasemida, ácido etacrínico, tiazidas, bumetanida... Inmunosupresores: tacrolimus, ciclosporina, rapamicina, everolimus... AINE: ibuprofeno, indometacina... |
| Ambientales | Metales pesados: plomo, mercurio, cadmio, cromo, platino... Hidrocarburos: herbicidas Disolventes orgánicos: gasolina, triclorometano, tricloroetileno... |
| Endógenos | Mioglobina, hemoglobina, proteínas... |

TABLA 2. Sustancias nefrotóxicas más comunes. AINE: antiinflamatorios no esteroideos.

Una sustancia nefrotóxica puede ejercer su efecto sobre la célula renal de forma directa o de forma indirecta, siendo la toxicidad directa la causa más común de daño renal.

a. Efecto tóxico directo

Las sustancias nefrotóxicas pueden interactuar directamente con los componentes de la membrana plasmática o ser captadas por células renales, ejerciendo así sus acciones tóxicas a nivel intracelular²⁶, alterando la permeabilidad de la membrana, inhibiendo procesos enzimáticos, interfiriendo en la síntesis proteica o alterando la actividad de las bombas de transporte. Cuando las toxinas son captadas por las células renales se producen efectos sobre la función lisosomal y mitocondrial. Algunas nefrotoxinas como gentamicina, modifican las propiedades biofísicas de los lisosomas alterando la permeabilidad de su membrana y estimulando la agregación de membranas³¹. Esto ocasiona la liberación de enzimas lisosomales produciendo fosfolipidosis, destrucción del lisosoma y necrosis celular⁷⁵. Por otro lado, la mitocondria de la célula tubular renal es el lugar de acción de muchas otras nefrotoxinas, interfiriendo en la fosforilación oxidativa y producción de ATP, síntesis de radicales de oxígeno altamente reactivos y la detoxificación mitocondrial de Ca^{2+} , modificando funciones de transporte celular y produciendo muerte celular por necrosis y apoptosis existiendo numerosos ejemplos experimentales como el daño nefrotóxico generado por gentamicina, ciclosporina (CsA) y cisplatino entre otros^{17,36,65,132,133}.

b. Efecto tóxico indirecto

En muchos casos una parte importante del efecto tóxico de las sustancias se debe a que inducen también una reducción del FSR. En la mayoría de los casos, este efecto no es directo sobre el músculo liso vascular, sino que está mediado por la liberación de factores vasoconstrictores (*platelet-activating factor* (PAF), angiotensina II, endotelina) o por la inhibición de factores vasodilatadores (óxido nítrico (NO)). La nefrotoxicidad inducida por fármacos como la CsA¹³³, gentamicina^{36,132} o cisplatino³⁶ está relacionada con la estimulación de la síntesis y liberación de PAF. Sin embargo, la angiotensina II^{57,115} se ha relacionado con la reducción del FG en tratamientos con gentamicina y la activación de la retroalimentación túbulo-glomerular por adenosina en la vasoconstricción asociada a CsA¹⁶. Otra posibilidad de que exista efecto nefrotóxico es que disminuya la producción de NO, efecto que ya ha sido demostrado en modelos de nefrotoxicidad por contrastes iodados¹⁴⁴ y CsA¹⁶.

1.3.- Procesos celulares involucrados en el daño renal

Las células de un organismo no viven indefinidamente y su vida media depende del tipo celular, aunque el número de células que compone un tejido de un organismo adulto permanece más o menos constante gracias a la regulación del balance entre

mitosis y muerte celular en un proceso denominado homeostasis¹²⁸. Los principales procesos que contribuyen al daño renal son la proliferación y muerte celular, el estrés oxidativo y la inflamación.

1.3.1.- Muerte celular

La muerte celular fisiológica se produce de una manera programada denominada apoptosis¹⁵⁶. Su principal diferencia con la necrosis es el requerimiento de energía por parte de la célula.

La **necrosis** se produce cuando el daño es letal o se produce una muerte accidental. Se origina debido a una lesión aguda e irreversible y que no puede ser reparada por los mecanismos de adaptación y resistencia. Los motivos por los cuales se origina pueden ser varios como agentes nocivos, aporte insuficiente de sangre al tejido (isquemia), falta de oxígeno (hipoxia), traumatismo, efecto de sustancias químicas y tóxicas, etc. Se origina por tanto un proceso de muerte celular violento con hinchazón de las células, deterioro de las estructuras celulares y paralización de las funciones del organismo. A su vez, la viabilidad celular disminuye al producirse una ruptura de la membrana plasmática, lisis celular y liberación al exterior del contenido citoplasmático y orgánulos que pueden originar a su vez reacciones inflamatorias⁹⁸.

Por otro lado, otro tipo de muerte celular implica la activación de mecanismos específicos, produciéndose un suicidio o muerte celular programada, genéticamente regulada y realizada de una manera ordenada y silenciosa: la **apoptosis** (Figura 3). Este proceso se produce de manera rápida (vida media de las alteraciones morfológicas 1-2 horas)¹² para asegurar el desarrollo, morfogénesis y mantenimiento de la homeostasis tisular, así como para controlar el número de células eliminando las infectadas, mutadas o dañadas^{32,168}.

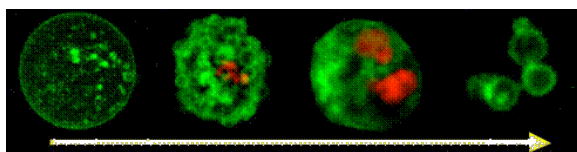


FIGURA 3. Avance cronológico del proceso de apoptosis. *Imagen obtenida de <http://www.mailxmail.com/curso-enfermedad-cancer/apoptosis-muerte-celular-programada>.

En la muerte por apoptosis, la cromatina y el núcleo se condensan y fragmentan, disminuyendo el tamaño nuclear (núcleo picnótico). Con el fin de evitar la pérdida del contenido celular, se mantiene la funcionalidad de la membrana plasmática que sufre la aparición de vesículas o "*blebs*" (cuerpos apoptóticos) y experimenta cambios bioquímicos, como en la disposición de los fosfolípidos⁴⁵. A consecuencia de la pérdida de iones K^+ y Cl^- , se produce una condensación citoplasmática. Esta pérdida de iones conlleva una pérdida de agua que supone la disminución del volumen celular^{97,98}. Otro

rasgo característico es la condensación y fragmentación internucleosomal del ADN que implicará la incapacidad celular para la replicación. Durante el proceso de apoptosis, se lleva a cabo la ruptura específica de un gran número de proteínas, producida por una familia de proteasas denominadas caspasas (cisteín aspartato proteasas), responsables de la eliminación del contacto entre células, desestructuración del citoesqueleto, desorganización de la envoltura nuclear, inhibición de la replicación y de las señales de supervivencia o activación de las endonucleasas responsables de la degradación del ADN. Tras realizarse estos procesos, la membrana celular que no se destruye engloba a los cuerpos apoptóticos que serán reconocidos por los macrófagos y fagocitados, evitando así que se produzca inflamación^{98,168}. Las diferencias principales entre necrosis y apoptosis están contenidas en la Tabla 3.

| APOPTOSIS | NECROSIS |
|--|--|
| Muerte fisiológica. Proceso regulado y controlado. | Muerte no fisiológica. Proceso no regulado. |
| Inducida por estímulos intra o extracelulares. | Inducida por un daño tisular o celular. |
| Proceso energéticamente activo. | Proceso energéticamente pasivo. |
| Mantenimiento estructural de orgánulos. | Desintegración desordenada de los orgánulos. |
| Fragmentación del ADN temprana. | Fragmentación del ADN tardía. |
| Fagocitosis de cuerpos apoptóticos. | Lisis celular en las células vecinas. |

TABLA 3. Características generales y diferencias de la muerte celular por apoptosis y necrosis.

Existen dos vías de inducción del mecanismo de apoptosis, la vía intrínseca o mitocondrial y la vía extrínseca o mediada por receptores de muerte.

❖ Vía intrínseca o mitocondrial

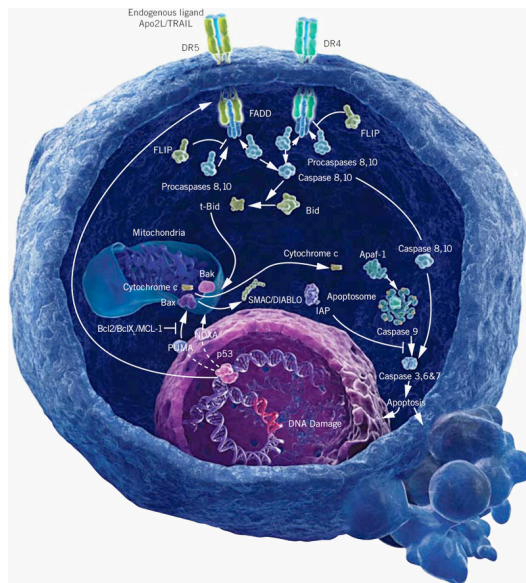
La vía mitocondrial se activa en respuesta a intromisiones externas y a daño del ADN (Figura 4). La presencia del estímulo activa a los miembros pro-apoptóticos de la familia Bcl-2 (Bax y Bid), permitiendo su permeabilización a la membrana mitocondrial, lo que hace que se libere citocromo c y se asocie con procaspasa-9, activando la caspasa-9 a través de Apaf-1 (*Apoptosis Protease-Activating Factor 1*) en un complejo denominado apoptosoma¹⁸¹. El apoptosoma hidroliza la procaspasa-3 a caspasa-3 activa que se encarga de ejecutar la apoptosis y de dar muerte finalmente a la célula (Figura 4).

La función clave de los miembros de la familia Bcl-2 es regular la aparición de factores pro-apoptóticos, mediados por la presencia de proteínas pro-apoptóticas (Bax y

Bid) y anti-apoptóticas (Bcl-2 y Bcl-XL) en particular la liberación del citocromo c, desde el compartimento intermembranal hasta el citosol^{2,175}.

❖ Vía extrínseca o de receptores de muerte celular

Se activa al realizarse la unión de ciertas citoquinas o ligandos a sus receptores transmembrana pertenecientes a la superfamilia del receptor de necrosis tumoral alfa (TNFR), Fas y TRAIL¹⁴⁸. El miembro de los receptores de muerte más estudiado y relevante es Fas (CD95 o Apo-1) al que se une su ligando, ligando de Fas (Fas-L)⁶⁵ en las balsas de colesterol para la transducción de la señal apoptótica. Cuando 3 complejos



trimerizan, los dominios de muerte intracelular se unen al dominio de muerte de una proteína adaptadora denominada FADD (*Fas-associated death domain*)⁶. FADD se une al dominio de muerte efectora de la procaspasa-8 que la activa proteolíticamente a caspasa-8 activa siendo liberada al citoplasma. La caspasa-8 activa procesa varias proteínas de la célula incluyendo la procaspasa-3 que resulta en su activación y en la ejecución de la muerte celular (Figura 4).

FIGURA 4. Mecanismos de muerte celular. Vía intrínseca (abajo) y vía extrínseca (arriba).

La vía intrínseca y extrínseca están conectadas a través de Bid, un miembro pro-apoptótico de la familia Bcl-2. La caspasa-8 media la ruptura de Bid (Figura 4) dando lugar a su forma truncada tBid, que incrementa su actividad pro-apoptótica y se desplaza a la mitocondria activando las proteínas Bax y Bak, también pertenecientes a la familia Bcl-2, provocando la liberación de citocromo c y desencadenando la vía intrínseca mediante permeabilización de la membrana mitocondrial^{2,3}.

1.3.2.- Estrés oxidativo

El estrés oxidativo (EO) es un estado del organismo en el que se altera el equilibrio entre especies oxidantes y especies antioxidantes⁴. Este desequilibrio se genera a consecuencia de un exceso de especies reactivas de oxígeno (ROS) y/o un defecto de los mecanismos antioxidantes, lo que produce daño celular y envejecimiento celular.

Los radicales libres de O_2 o ROS son átomos o moléculas que presentan un electrón desapareado en la capa de valencia u orbital más externo que les confieren su elevada reactividad. Las principales ROS son el radical superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el radical hidroxilo (OH^\cdot), el O_2 singlete (1O_2) y el peroxinitrito ($ONOO^\cdot$). Una de las principales fuentes de las ROS es la cadena respiratoria. En ella, los electrones procedentes de enzimas como NADH a partir de reacciones redox, se desvían a la formación de ROS, que son capaces de oxidar macromoléculas biológicas tales como proteínas, lípidos o ácidos nucleicos, dando lugar a lesiones celulares importantes como la peroxidación lipídica o inflamación^{48,58}.

Son numerosas las enfermedades en las que el EO está involucrado (FRC, FRA, aterosclerosis, parkinson, alzheimer...), aunque también pueden resultar beneficiosas al intervenir en la eliminación de patógenos.

El EO juega también un papel importante en la nefrotoxicidad generada por gentamicina⁷⁹ ya que tratamientos realizados con una amplia variedad de agentes antioxidantes disminuyen considerablemente la disfunción renal y el daño celular generado por la misma^{28,79}. Las ROS, principalmente el O_2^- y los OH^\cdot causan la muerte celular a través de distintos mecanismos como son (a) la inhibición de la cadena transportadora de electrones así como la supresión de la producción de ATP y respiración celular, (b) liberación de citocromo c, (c) daño en el ADN, (d) peroxidación lipídica, desestabilización de la membrana celular, activación de receptores de muerte (Fas) por la alteración de los lipid rafts y la producción de metabolitos proapoptóticos, (e) daño oxidativo en distintos orgánulos como el retículo endoplasmático (RE) e (f) inhibición del transporte de Na^+ por inhibición oxidativa de la bomba de Na^+/K^+ ATPasa y canales de Na^+ que provoca un hinchamiento de la célula, pérdida de la integridad de la membrana y necrosis.

1.3.3.- Inflamación y fibrosis

La inflamación se define como una reacción defensiva local del sistema inmune a estímulos o inductores (exógenos o endógenos) nocivos de muy diversa naturaleza: físicos, químicos y microorganismos tales como parásitos, hongos y bacterias. La

inflamación suele ser de carácter local aunque pudiera conducir a la muerte del organismo si se produjese en órganos vitales. Aunque dolorosa, la inflamación es una respuesta reparadora, encaminada a restaurar la homeostasis, un proceso que implica el consumo de gran cantidad de ATP. Puede transcurrir hacia una situación crónica dando lugar a enfermedades degenerativas como artritis o cáncer aunque suele venir acompañada de una respuesta de fase aguda en las que se producen cambios en el perfil de las proteínas y leucocitos que conduce al fracaso funcional de los distintos órganos.

En el proceso inflamatorio intervienen gran cantidad de mediadores (histamina, enzimas proteolíticas) alterando los estados funcionales de las células de tejidos y órganos, y produciendo efectos quimiotácticos que permiten su adaptación y reparación del daño causado por los inductores mediante la llegada de macrófagos, linfocitos, inmunoglobulinas, factores de coagulación y proteínas de fase aguda. Estas células liberan citoquinas como interleuquinas (IL), interferones (IFN) y factores de necrosis tumoral (TNF) regulando la respuesta inflamatoria^{5,124}.

La inflamación juega un papel importante en la nefrotoxicidad de gentamicina⁸⁹. De hecho, todos los tipos celulares del riñón son capaces de producir quimioquinas proinflamatorias. La presencia de gentamicina activa la vía del factor nuclear kappa B (NFκB)¹⁶¹. Se incrementa la degradación por fosforilación, ubiquitinación y entrada en el proteosoma del inhibidor del factor (IκB) activando NFκB que va al núcleo donde se une al ADN para expresar moléculas de adhesión leucocitaria, proteínas, citoquinas y enzimas⁸⁹. Aumenta la expresión de TNFα, moléculas de adhesión celular como VCAM-1 (*Vascular Cell Adhesion Molecule 1*) o la proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1)^{14,89}. La presencia de estas citoquinas provoca la concentración de monocitos y macrófagos en respuesta a estímulos nocivos y su migración al tejido dañado. Cuando la respuesta inflamatoria se hace crónica, comienza a aparecer fibrosis. La fibrosis consiste en un endurecimiento de los tejidos u órganos debido a la formación de nuevas fibras de tejido conectivo como consecuencia de un aumento en la producción de colágeno. Los órganos y tejidos se endurecen, por lo que ven limitada su función. En estadios avanzados de fibrosis, el tejido funcional de los órganos se halla casi desaparecido provocando un grave trastorno en su funcionalidad, hasta el punto de que pudiera causar la muerte. Durante el proceso de formación de fibras de colágeno intervienen numerosas enzimas y proteínas profibróticas como el factor de crecimiento transformante β (TGFβ) o el factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF) cuyo aumento de expresión hace prever la aparición de fibrosis⁵¹.

2.- Gentamicina y su efecto nefrotóxico

El desarrollo de la industria antimicrobiana comenzó en 1935 con la aparición de las sulfamidas, aunque el primer gran descubrimiento de antibióticos (agentes antimicrobianos de origen microbiano) lo realizó Alexander Fleming en 1929 con la penicilina. A partir de los años cuarenta se han aislado y caracterizado miles de fármacos y antibióticos de origen natural o sintético que se clasifican en familias en función de su asociación microbiana. Una de estas familias es la de los antibióticos aminoglucósidos que se caracterizan por ser inhibidores de la síntesis de proteínas.

2.1.- Aminoglucósidos

Los aminoglucósidos (AG) son un grupo de antibióticos bactericidas que detienen el crecimiento bacteriano. Su mecanismo de acción presenta un doble efecto bacteriostático y bactericida. El primero es debido a que actúan a nivel del ribosoma en la subunidad 30S bacteriana interfiriendo en la elongación de la cadena polipeptídica y causando lecturas erróneas en el código genético dando lugar proteínas anómalas. Algunas de estas proteínas son de membrana, que al no presentar un funcionamiento normal se insertarían en la misma provocando porosidades o canales anómalos en la membrana externa conduciendo a un estado de “excitación membranaria” con pérdida de moléculas y entrada masiva de AGs (efecto bactericida) y otras drogas al interior celular. Los AG presentan cualidades de un antimicrobiano muy interesante: (a) potente capacidad bactericida, (b) no se afectan por el inóculo bacteriano, (c) comportamiento fármaco-cinético predecible y dosis-dependiente, (d) presenta sinergismo con otros antibióticos, (e) bajo coste y (f) baja resistencia³⁸. Su origen es natural o semisintético (producidos por bacterias Gram-negativas) y su estructura química consiste en uno o varios aminoazúcares unidos por puentes glucosidados a un anillo aminociclitol, denominándose correctamente “aminoglicósidos aminociclitoles”, más comúnmente conocidos como “aminoglucósidos”.

Los AG se suministran por vía intramuscular (i.m.) o intravenosa (i.v.)¹⁵³ mientras que su eliminación es por vía renal, principalmente por FG. A nivel celular, los AG se acumulan principalmente en la corteza de las PTEC, generando daño renal que dependerá del tipo de AG suministrado y que depende de factores como las cargas eléctricas o el mayor descenso de pH en el volumen intracelular. Los AG llegan al interior celular a través de vesículas tras unirse a ellas en el borde en cepillo acumulándose en los lisosomas donde se activan fosfolipasas lisosomales⁴⁷, dando lugar a vacuolización citoplasmática y edema mitocondrial antes de la muerte de la célula⁵⁹. Gentamicina es el antibiótico AG estudiado en esta tesis.

2.2.- Gentamicina

La gentamicina (2-[4,6-diamino-3-[3-amino-6-(1-metilaminoetil)tetrahidropiran-2-il]oxi-2-hidroxi-ciclohexoxi]-5-metil-4-metilamino-tetrahidropiran-3,5-diol) es un antibiótico AG que deriva de la bacteria *Micromonospora purpurea* (Figura 5). Se utiliza en el tratamiento de infecciones en el ojo contra bacterias sensibles, principalmente causadas por bacterias Gram-negativas (*Escherichia coli*, especies de *Proteus*, *Pseudomonasaeruginosa*, *Enterobacter*, especies de *Staphylococcus*...). También se usa ampliamente para tratar infecciones graves de piel, pulmón, estómago, vías urinarias, sangre y heridas cutáneas. Su principal inconveniente son sus efectos secundarios destacando como más importantes su elevada ototoxicidad y sobre todo la nefrotoxicidad, que hacen que se utilice con precaución y en ambos casos únicamente cuando la administración de otros antibióticos no haya sido eficaz. Aún así, sigue siendo el AG de elección para las infecciones nosocomiales por enterobacterias en instituciones con mínima resistencia bacteriana a la misma¹⁰³.

La nefrotoxicidad causada por gentamicina debido al perjuicio que produce ha sido muy estudiada previamente en modelos experimentales tanto en animales¹²⁰ como en humanos¹⁷⁰ para identificar los mecanismos implicados en su toxicidad, así como posibles estrategias nefroprotectoras frente a la misma^{72,84,86}.

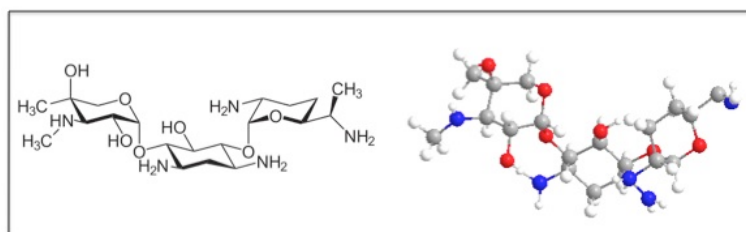


FIGURA 5. Estructura química de gentamicina. Fórmula $C_{21}H_{43}N_5O_7$; Peso Molecular: 477.596 g/mol.

Su mecanismo de acción es el común a los AG descrito anteriormente consistiendo en la interferencia en la síntesis normal de proteínas.

2.2.1.- Nefrotoxicidad: Mecanismos de acción de gentamicina en el túbulo proximal

Gentamicina debido a su tamaño y carga policationica atraviesa pobremente las membranas biológicas que carecen de mecanismo de transporte, lo que explica las bajas concentraciones alcanzadas en casi todos los tejidos humanos. Las PTEC constituyen una excepción, ya que poseen un mecanismo de transporte particular y pueden concentrar gentamicina hasta niveles muy superiores a los encontrados en plasma¹⁰³. De

hecho el mecanismo por el cual la gentamicina produce daño renal en las PTEC está totalmente asociado a su entrada y acumulación en las células por endocitosis^{70,143,152} mediante la acción de una proteína receptora-transportadora localizada principalmente en la cara apical del borde del cepillo de las PTEC denominada megalina^{27,107,109} (Figura 6), perteneciente a la familia de receptores de lipoproteínas de baja densidad (LDLR)^{62,174}.

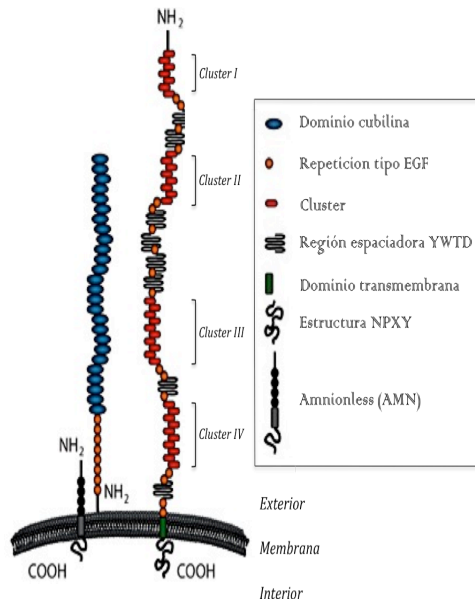


FIGURA 6. Representación esquemática de la estructura de megalina *Imagen obtenida de Nagai, J.¹⁰⁶. Peso molecular: 519.636 KDa. La región amino terminal posee 4 cluster ricos en cisteína. Presenta 40 aminoácidos que contiene 6 cisteínas residuales y SDE (Ser-Asp-Glu) permitiendo la alta afinidad de unión de las secuencias cargadas positivamente⁸⁰. Cluster rodeados de repeticiones tipo EGF (*Epidermal Growth Factor*) y regiones espaciadoras que contienen una estructura tipo YWTD (Tyr-Trp-Thr-Asp) responsables de la disociación dependiente de pH de los ligandos en el endosoma³⁰.

El proceso de entrada a la célula requiere la unión electrostática de gentamicina con las cargas negativas de los fosfolípidos de membrana⁴⁹. Tras la expresión de megalina, gentamicina pasa vía endocitosis al compartimento endosomal y se acumula en el aparato de Golgi, el RE y principalmente en los lisosomas^{140,152} donde se une a fosfolípidos de membrana que poseen grupos amino cargados polibásicos a pH fisiológico causando fosfolipidosis lisosomal (Figura 7), que estará íntimamente relacionada con el nivel de toxicidad de la gentamicina^{113,167}. Al haber un exceso de gentamicina en el endosoma, su membrana se rompe y el contenido se filtra al citosol activando proteasas como catepsinas que catalizan la activación proteolítica de las caspasas ejecutoras 3 y 7 y activan la vía mitocondrial de la apoptosis mediante la activación de Bid^{24,179}, lo que conlleva un aumento de los niveles de Bax⁶¹, interrupción de la cadena respiratoria y producción de EO^{28,173}. En ausencia de ATP, las catepsinas en el citosol producen una proteólisis masiva que conduce a muerte celular por necrosis⁵².

Por otro lado, la acumulación de gentamicina en el RE inhibe la síntesis de proteínas y perjudica su correcto plegamiento⁶¹ generando EO y activando la apoptosis mediante calpaínas y caspasa-12. La muerte en las PTEC generada por gentamicina puede producirse tanto por apoptosis^{85,94} como por necrosis⁴⁰, siendo en todo caso dosis-

dependiente y relacionado a la citotoxicidad por coadministración de otros fármacos como el cisplatino o efectos secundarios como la citotoxicidad a consecuencia de un aumento del EO^{138,149}.

Si bien la toxicidad por gentamicina se debe principalmente a su introducción en la célula a través de megalina, existen otras vías por las que ésta puede producir daño renal. La activación de receptores sensibles a calcio extracelular (CaSR) en presencia de gentamicina y otros AG induce un cierto grado de apoptosis en algunas células tubulares que expresan dicho receptor, mientras que en células carentes de CaSR no tiene lugar dicho proceso de apoptosis⁹⁶ (Figura 7).

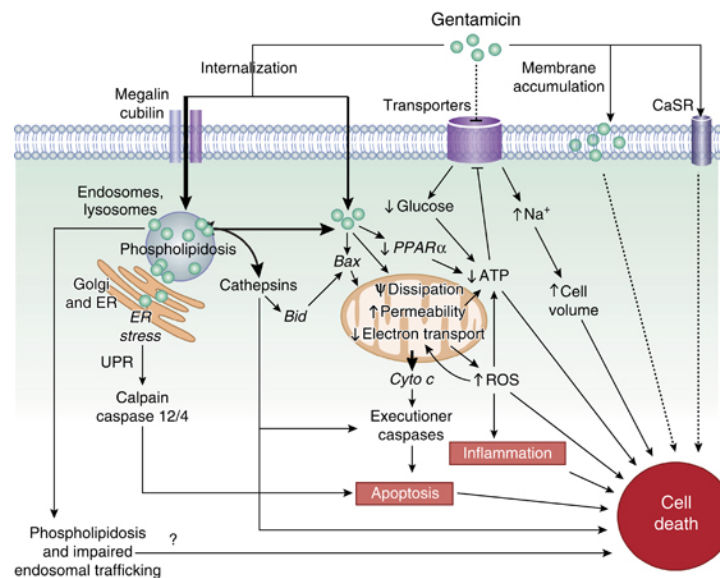


FIGURA 7. Mecanismos y procesos de señalización celular por los que gentamicina produce efecto citotóxico en el túbulo proximal. ATP: adenosin-trifosfato; CaSR: receptor extracelular sensible a Ca^{2+} ; PPAR α : Receptor activado por el proliferadores peroxisomales alfa; Cyto c: citocromo c; ER: retículo endoplasmático; UPR: respuesta de proteínas no plegadas; ROS: especies reactivas de oxígeno; ?: mecanismos de muerte celular no conocidos completamente. *Imagen obtenida de López-Novoa, J.M.⁹⁶.

Estudios recientes han mostrado que un aspecto crítico en la citotoxicidad generada por gentamicina en el túbulo proximal es su concentración citosólica y no su acumulación en los lisosomas^{145,146}. No obstante, otros autores consideran que sólo una pequeña cantidad de gentamicina llega directamente al citosol y núcleo celular independientemente de la que llega por endocitosis a través de megalina¹⁰⁵. En cualquier caso, el efecto más importante que conduce a la muerte celular ocurre cuando una determinada concentración de gentamicina presente en los lisosomas, RE o aparato de Golgi excede un límite y desestabiliza su membrana¹¹¹, liberando dicha gentamicina y activando la vía mitocondrial de la apoptosis y generando inflamación y EO.

Consecuentemente, gentamicina inhibe una gran variedad de transportadores de membrana celulares tanto en el borde en cepillo como en la cara basolateral incluyendo el cotransportador Na-Pi¹⁵⁴ y el intercambio Na⁺-H⁺⁹³ y el transporte de Na⁺ electrogénico¹⁶³ afectando a la reabsorción tubular y disminuyendo la viabilidad celular. Estos procesos conducen a hipercalcemia e hiper/hipomagnesemia antes incluso de que se den señales evidentes de toxicidad y daño renal.

La primera sintomatología del daño renal tras la administración de gentamicina se caracteriza por un aumento de la excreción urinaria de enzimas tubulares (alanina aminopeptidasa, β -D-glucosamina y fosfatasa alcalina), proteinuria e incremento en la excreción de β 2-microglobulina. Posteriormente aparecen modificaciones en el sedimento urinario (leucocituria y cilindruria) y finalmente disminuye la FG, aumentando el nitrógeno ureico y la creatinina plasmática. Las alteraciones enzimáticas generan marcadores precoces del daño renal, en la que la determinación de N-acetil-beta-D-glucosaminidasa (NAG) en orina es la más utilizada para la detección temprana de los efectos tóxicos. Los cambios histológicos incluyen alteraciones en los lisosomas, borde en cepillo, RE, mitocondrias y citoplasma llegando en casos de extrema toxicidad a la necrosis celular¹⁰³.

3.- Cilastatina y su efecto nefroprotector

3.1.- Perspectiva histórica. Imipenem-cilastatina

3.1.1.- Imipenem

Imipenem es un antibiótico β -lactámico perteneciente al subgrupo de los carbapenemes, cuyo espectro de acción incluye a las bacterias Gram-negativas y Gram-positivas, así como especies productoras de β -lactamasa interfiriendo en su habilidad de formar paredes celulares.

El imipenem sufre un extenso metabolismo dependiente de la especie, que se manifiesta por una baja recuperación de droga activa en la orina⁷³. Estudios *in vitro* e *in vivo* demostraron que este metabolismo se producía por acción de una enzima denominada dehidropeptidasa I (DHP-I)⁴¹ en el borde en cepillo de las PTEC. La DHP-I hidroliza el anillo β -lactámico del imipenem y lo inactiva mediante un fenómeno denominado metabolismo post-excretor sin que afecte a otros antibióticos β -lactámicos como las penicilinas y cefalosporinas.

El espectro antibacteriano del imipenem era el idóneo para el tratamiento de bacterias Gram-negativas en sepsis de origen intestinal o renal, pero su degradación renal provocaba concentraciones subóptimas del fármaco en el tracto urinario⁸¹,

limitando su uso en el tratamiento de lesiones sistémicas. A esto había que sumarle además que altas concentraciones de imipenem en el túbulo proximal podían ser tóxicas, por lo que para su utilización, tuvo que sintetizarse y administrarse conjuntamente con él un inhibidor de la DHP-I, la cilastatina¹¹⁴.

3.1.2.- Cilastatina, estructura y función

La cilastatina es la sal monosódica de ácido (Z)-7-[(2R)-2-amino-3-hidroxi-3-oxopropil]sulfanil-2-[[[(1S)-2,2-dimetilciclopropanocarbonil]amino]hept-2-enoico (Figura 8). Actúa como inhibidor competitivo reversible de la DHP-I impidiendo la hidrólisis de enlaces peptídicos y la apertura del anillo β -lactámico del imipenem. De esta manera, el antibiótico no metaboliza en su forma inactiva y no se absorbe al interior de la celular tubular, aumentando la concentración del imipenem en la orina^{13,25}.

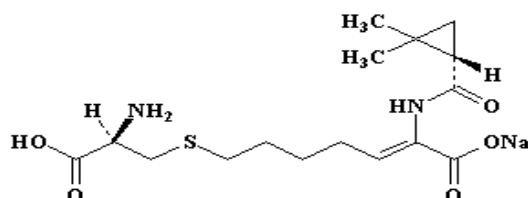


FIGURA 8. Estructura química de cilastatina. Fórmula $C_{16}H_{26}N_2O_5S$; Peso Molecular: 358.454 g/mol.

Al administrar conjuntamente imipenem con cilastatina (I/C) en una relación 1:1 (el efecto inhibitorio de la DHP-I es de 8-10 horas)¹¹⁴, se alcanza una tasa de excreción urinaria del 70% de la dosis administrada inicialmente de imipenem. El pico en sangre de I/C se alcanza inmediatamente después a la infusión, manteniéndose durante 4-6 horas. La concentración en suero y la biodisponibilidad aumenta linealmente con la dosis suministrada. Estudios con múltiples dosis demostraron que el fármaco no se acumula en individuos sanos (Tabla 4).

| VALORES FARMACOCINÉTICOS DE CILASTATINA COADMINISTRADA CON IMIPENEM 1:1* | |
|--|-------------------------------------|
| Vol. de distribución en el compartimento central | 0.14 ± 0.03 L/kg |
| Concentración plasmática 1h post-infusión i.v. | 19.1 ± 46 μ g/mL |
| Vida media de eliminación | 0.84 ± 0.1 horas |
| Aclaramiento plasmático | 12.4 ± 1.1 L/hora por $1.73m^2$ |
| Aclaramiento renal | 8.0 ± 1.2 L/hora por $1.73m^2$ |

TABLA 4. Valores farmacocinéticos de cilastatina con imipenem. i.v.: intravenoso. *Datos extraídos de Drusano et al.³⁷

La medición de la síntesis de leukotrieno E4 formado por la acción de la DHP-I sobre el leukotrieno D4, sirvió para demostrar la interacción de cilastatina con esta

enzima. Este proceso se inhibía en presencia de cilastatina demostrando que, efectivamente, existía una especificidad por DHP-I^{18,78}.

Cilastatina es asimismo capaz de inhibir de manera selectiva y dosis-dependiente sistemas de OATs a nivel basolateral situados en el segmento S2 de las PTEC^{44,160} encargados de la captación activa de fármacos y sustancias endógenas de la sangre y transporte al interior celular⁸³.

3.2.- Dehidropeptidasa renal I

La DHP-I es una glicoproteína que forma parte en el proceso de hidrólisis del enlace peptídico de los dipéptidos, dehidropéptidos y de antibióticos β -lactámicos en conformación *trans* (como el imipenem) presentes en la orina⁷⁷. Se trata de una metaloenzima con iones zinc localizada en el borde en cepillo de las PTEC del riñón aunque también se ha descrito en pulmones, gránulos de zimógeno del páncreas exocrino y adipocitos de humano, rata y cerdo⁶⁰.

Estructuralmente, DHP-I es un homodímero que consta de dos subunidades (α,β) constituidas cada una por un péptido de 369 aminoácidos (42 kDa) y cuyos sitios activos están compuestos por iones de Zn orientados hacia las microvellosidades del túbulo renal¹¹² (Figura 9).

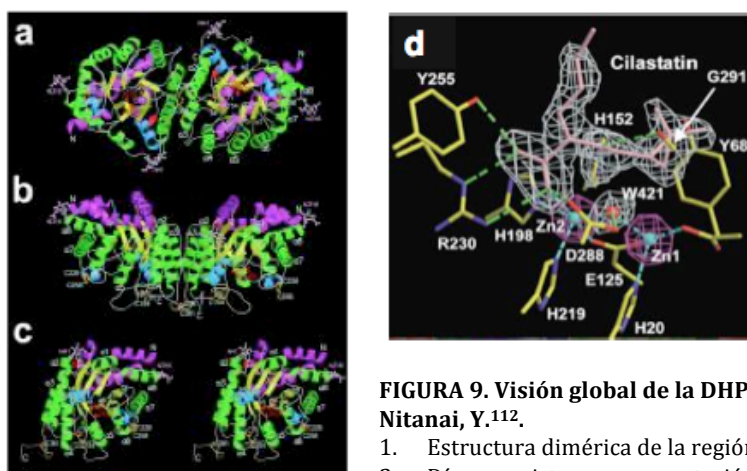


FIGURA 9. Visión global de la DHP-I. *imagen modificada de Nitani, Y.¹¹².

1. Estructura dimérica de la región de unión a la membrana.
2. Dímeros vistos con una rotación de 90°.
3. Representación de una subunidad del monómero.
4. Sitio activo de la DHP-I con el ligando cilastatina.

La DHP-I se ancla a la membrana covalentemente con un residuo glicosil-fosfatidil-inositol (GPI)^{1,46,159} que se localiza en dominios de membrana con características especiales, denominados balsas de colesterol o *lipid rafts*^{17,65,104}.

3.3.- Balsas de colesterol

Las balsas de colesterol (BDC) son compartimentos situados en la membrana ricos en colesterol y glicoesfingolípidos. Los glicolípidos se asocian por sus largas cadenas

aciladas formando agrupaciones compactas y estabilizadas por puentes de hidrógeno. El colesterol se intercala entre las cadenas hidrocarbonatadas disminuyendo así su flexibilidad, compactando la estructura de la bicapa y modificando su fluidez¹⁰¹. Las balsas de colesterol están implicadas en procesos de transporte transmembrana, endocitosis, señalización y transducción de señales implicadas en procesos como apoptosis o señalización celular¹⁵.

3.4.- Evidencias de nefroprotección por cilastatina

3.4.1.- Interacción con ciclosporina

La CsA es un fármaco inmunosupresor muy utilizado para reducir el riesgo de rechazo de órganos pero presenta un importante efecto nefrotóxico¹⁹. Estudios realizados a finales de los 80 destinados a probar la interacción de CsA con otros fármacos, demostraron una disminución de la toxicidad renal de la misma en ratas al asociarse con I/C^{56,150}. En los años 90, estudios en humanos sometidos a trasplante cardíaco, de pulmón, riñón o médula ósea con tratamiento con CsA también mostraron disminuciones de la nefrotoxicidad ejercida por la misma, cuando se utilizaba además I/C^{10,19,54,99}. Todos estos estudios fueron incluidos y analizados por nuestro grupo en la realización de un metaanálisis¹⁶², y hemos demostrado asimismo en estudios *in vitro* como cilastatina es capaz de proteger las PTEC del daño tóxico y la muerte celular por CsA y tacrolimus impidiendo la acumulación intracelular de los mismos¹²³.

3.4.2.- Interacción con vancomicina

La vancomicina es un glicopéptido usado como antibiótico contra las bacterias Gram-positivas pero al igual que CsA, presenta efectos nefrotóxicos importantes^{21,134}. Estudios previos en los años 90 mostraron en modelos animales, como I/C o cilastatina sola eran capaces de reducir la nefrotoxicidad de vancomicina inhibiendo su acumulación renal^{164,165,82}.

3.4.3.- Interacción con cisplatino

De manera contraria a CsA o vancomicina, ninguna evidencia de nefroprotección con I/C o cilastatina ha sido demostrada en la literatura. Nuestro grupo ha sido el primero en mostrar como cilastatina es capaz de proteger del daño renal producido por cisplatino *in vitro* e *in vivo*, sin modificar además la eficacia terapéutica del quimioterápico^{17,65,87}.

III.-HIPÓTESIS

HIPÓTESIS I

Cilastatina es capaz de reducir la toxicidad renal dosis-dependiente inducida por el tratamiento con gentamicina tanto *in vitro* (cultivos de células epiteliales del túbulo proximal) como *in vivo* (toxicidad renal en un modelo de rata), sin afectar al efecto bactericida del antibiótico.

HIPÓTESIS II

La protección renal ofrecida por cilastatina está directamente relacionada a su unión con la enzima dehidropeptidasa renal I, que se halla localizada en las balsas de colesterol en borde en cepillo de las células epiteliales del túbulo proximal. Por tanto, al producirse la interacción, cilastatina interfiere en la toxicidad generada por gentamicina en dos aspectos:

- Disminuye el transporte y acumulación intracelular del antibiótico por la interferencia con su receptor (megalina) en las balsas de colesterol.
- Interfiere en las vías reguladoras de muerte celular por apoptosis, estrés oxidativo e inflamación.

IV.- OBJETIVOS

OBJETIVO PRINCIPAL

El objetivo fundamental de esta tesis es estudiar a nivel celular y molecular el efecto protector de cilastatina sobre la nefrotoxicidad inducida por gentamicina. Este objetivo general puede desglosarse en una serie de objetivos concretos:

OBJETIVOS CONCRETOS

- Demostrar que cilastatina no presenta ningún efecto nocivo sobre las células epiteliales del túbulo proximal en modelos *in vitro* e *in vivo*.
- Comprobar experimentalmente el efecto de cilastatina sobre la muerte celular en modelos celulares de toxicidad renal generados por gentamicina.
- Estudiar la nefroprotección llevada a cabo por cilastatina *in vivo*, en un modelo de fracaso renal agudo tóxico inducido por gentamicina.
- Demostrar que el efecto de cilastatina es específico sobre el túbulo proximal y no resta poder bactericida a la gentamicina sobre sus dianas terapéuticas (bacterias).

V.- MATERIALES Y MÉTODOS

***V.I.- EXPERIMENTOS IN
VITRO***

1.- Fármacos en estudio

1.1.- Gentamicina

Agente antibiótico AG de fórmula $C_{12}H_{43}N_5O_7$ y peso molecular 449,5 g/mol fue adquirido en polvo a Guinama (Valencia, España). La estructura química de la gentamicina puede observarse en la Figura 5 del apartado “*Introducción*”. Las dosis utilizadas en los experimentos *in vitro* (10, 20 y 30 mg/mL) han sido seleccionadas en base a estudios previos en el laboratorio usando dosis-respuesta y por revisión bibliográfica de la literatura.

1.2.- Cilastatina

Inhibidor de la DHP-I, de fórmula $C_{16}H_{26}N_2O_5S$ y peso molecular 358.454 g/mol fue amablemente cedida en forma de polvo por Merck Sharp & Dohme (MSD, Madrid, España). La estructura química de cilastatina puede observarse en la Figura 8 del apartado “*Introducción*”. La concentración de cilastatina utilizada en la mayor parte de los experimentos *in vitro* fue de 200 µg/mL y se seleccionó por ser cercana a los niveles plasmáticos encontrados en pacientes tratados con I/C, a pesar de no ser la concentración más alta ensayada ni con la que hemos obtenido máxima protección¹⁷.

2.- Cultivos celulares

2.1.- Células renales

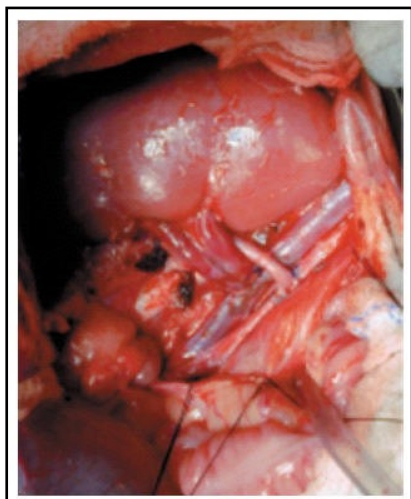
Todos los estudios *in vitro* se realizaron con cultivos celulares primarios de túbulo proximales de riñones de cerdos enanos (estirpe *Maryland*). Estos cerdos se caracterizan por ser homocigotos para el Complejo Mayor de Histocompatibilidad, seleccionados genéticamente para el estudio de trasplantes de órganos¹³⁶. Los animales procedían de la granja especializada del Complejo Agropecuario de Aranjuez del Instituto Tecnológico de Desarrollo Agrario (ITDA) de la Consejería de Medio Ambiente de la Comunidad de Madrid.

Los animales seleccionados para el estudio tenían una edad media de 3 meses y un peso medio de $31,3 \pm 0,7$ kg, siendo indistintamente machos o hembras.

El manejo de los animales de experimentación utilizados se realizó siguiendo la normativa legal vigente (Real Decreto 1201/2005, del 10 de Octubre, 252/2005), con ayuda de personal cualificado y bajo la supervisión directa del veterinario responsable.

2.1.1.- Aislamiento de túbulos proximales

Doce horas antes de la intervención, los cerdos fueron sometidos a ayuno con agua *ad libitum*. El animal fue premedicado 15 minutos antes de la cirugía con ketamina 10 mg/kg peso y atropina 0.0025 mg/kg i.m., anestesiado con una dosis de inducción de propofol 10 mg/kg i.v. e intubado. La anestesia durante la cirugía se mantuvo con peróxido de nitrógeno/oxígeno (4 L/min NO₂ y 2 L/min O₂), propofol (Diprivan®) 15 mg/kg/h, fentanilo (Fentanest®) 0.75 mg/20min y bromuro de pancuronio (Pavulon®) 2mg/20 min. Tras la intervención el animal se sacrificó con sobredosis anestésica y KCl.



El riñón se extrajo en quirófano bajo condiciones de esterilidad mediante nefrectomía simple unilateral por vía transperitoneal (Figura 10). Una vez extraído, se sumergió inmediatamente en HAM'S F12 (Bio-Whittaker Verviers, Bélgica) a 4° con penicilina (100 U/mL)/estreptomicina (100 µg/mL) (Bio-Whittaker).

FIGURA 10. Extracción mediante nefrectomía simple unilateral de riñón de cerdo.

Bajo una campana de flujo laminar (Gelaire Flow Laboratories, modelo BSB 3A), el riñón se decapsuló y se separaron corteza y médula. La corteza se cortó en finas láminas con ayuda de un microtomo Staddie-Riggs (Thomas Scientific, EEUU). Estas láminas se incubaron con colagenasa A (30 mg/riñón) (Sigma-Aldrich, S. Louis, MO, EEUU) diluida en HAM'S F12 (50 mL/riñón, concentración final de colagenasa 0.6 mg/mL) durante 20-30 minutos en agitación a 37°C, equilibradas con carbógeno a saturación. La digestión se paró con HAM'S F12 frío. El producto digerido se filtró a través de una malla metálica de 250 µm (Endecotts LTD) y se lavó tres veces con HAM'S F12 a 1000 revoluciones por minuto (rpm) en una centrífuga Jouan BR4i (DJB Labcare, Buckinghamshire, Reino Unido) durante 2 minutos. El sedimento final presentó una pureza final del 80% de túbulos proximales.

Para aumentar la pureza y eliminar contaminantes, el sedimento se sometió a un gradiente de Percoll (Amersham Biosciences AB, Uppsala, Suecia) isotónico al 45% en tampón Krebs-bicarbonato (NaCl 112 mM, KCl 3.3 mM, H₂KPO₄ 1.2 mM, MgSO₄ · 7H₂O 1.2 mM, CaCl₂ 0.5 mM, 95% O₂/5% CO₂) centrifugándose a 1300 rpm a 4°C durante 30 minutos (Sorvall RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge, Rotor SS-34), generándose un gradiente de densidad en el que se separan en diferentes fracciones los segmentos

corticales de la nefrona (Figura 11). En la cuarta banda se encuentran los túbulos proximales con una pureza superior al 98%. Esta banda fue recogida con una pipeta Pasteur estéril y se lavó tres veces con HAM'S F12 frío a 1000 rpm para eliminar los restos de Percoll. Para conocer el rendimiento se pesó el sedimento resultante del último lavado.



FIGURA 11. Aislamiento de túbulos proximales. Gradiente de Percoll isotónico al 45% obtenido tras la centrifugación a 1300 rpm durante 30 minutos a 4°C. El tubo de la izquierda contiene marcadores de densidad. En el tubo de la derecha se ha cargado la corteza de un riñón digerida con colagenasa. La fracción 1 contiene glomérulos, 2 y 3 túbulos distales de distinta longitud y la fracción 4 contiene túbulos proximales con una pureza del 98%. A la derecha, túbulos proximales obtenidos de la fracción 4.

2.1.2.- Cultivo Primario de Células de Túbulo Proximal

Los túbulos proximales obtenidos se resuspendieron a una concentración final de 0.66 mg/mL en un medio de cultivo compuesto de HAM'S F12:DMEN (Bio-Whittaker) en proporción 1:1 y suplementado con HEPES 25 mM (Bio-Whittaker), glutamina 2.5 mM (Bio-Whittaker), aminoácidos no esenciales 1% (Bio-Whittaker), penicilina 100 U/mL, estreptomicina 100 µg/mL (Bio-Whittaker), suero bovino fetal (SBF) 2% (Sigma-Aldrich), bicarbonato sódico 20 mM (Merck), hidrocortisona $5 \cdot 10^{-8}$ M (Sigma-Aldrich), insulina 5 mg/mL, transferrina 5 mg/mL y selenio 5 ng/mL (Sigma-Aldrich). Finalmente se repartieron 5 mL de la suspensión en placas de cultivo de 60 mm de diámetro con una superficie tratada para una óptima adherencia celular (Corning, NY, EEUU). Las placas se mantuvieron en un incubador (Heraeus, Hanau, Alemania) a 37°C y 5% de CO₂. Hasta el cuarto día no se realizó el primer cambio de medio para permitir la adhesión de las PTEC. A partir del cuarto día, el medio de cultivo se renovó cada 2-3 días. Las células alcanzan la confluencia a los 8-10 días y comienzan a presentar senescencia a los 12-13 días.

2.1.3.- Cultivo Secundario de Células de Túbulo Proximal

Las PTEC no utilizadas de inmediato fueron congeladas. Tras alcanzar la confluencia, se retiró el medio de cultivo y se lavó con tampón fosfato salino (PBS) 1X (AccuGENE, Verviers, Bélgica). Posteriormente se retiró el PBS y se añadió 1 mL de tripsina (Invitrogen Calrsbad, CA, EEUU), por placa de 60 mm que se mantuvo hasta que las células comenzaron a desprenderse (1-2 minutos). Para parar la acción de la tripsina se añadió medio de cultivo, y tras recoger las células, se lavaron a 1500 rpm durante 2 minutos. Por cada grupo de tres placas de 60 mm, se adicionó al sedimento 1.5 mL de SBF pipeteándose en viales de congelación con dimetil-sulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich) al 10% con el fin de preservar las estructuras celulares. Las PTEC fueron congeladas inmediatamente en N₂ líquido.

El proceso de descongelación de las células se llevó a cabo pasando el vial de congelación directamente del N₂ líquido a un baño de 37°C. Nada más empezó el contenido a descongelarse, se diluyó en medio de cultivo y se centrifugó a 1500 rpm durante 2 minutos para eliminar el DMSO. El sedimento resultante tras la centrifugación se diluyó en medio de cultivo (1 vial/100 mL) y se sembró en placas para experimentación.

3.- Estudio de muerte celular

3.1.- Morfología celular y nuclear

Con el fin de detectar muerte celular en los cultivos de las PTEC, se observó la morfología de éstas tras su tratamiento con gentamicina (10, 20 y 30 mg/mL) en presencia/ausencia de cilastatina (200 µg/mL) durante 24 horas utilizando un microscopio en modo contraste de fases Olympus IX70 (Olympus, Hamburgo, Alemania).

De la misma manera se procedió al análisis de la morfología nuclear visualizando los núcleos tras tinción del ADN con el agente fluorescente diclorohidrato de 4', 6-diamidina-2-fenilindol (DAPI) (Sigma-Aldrich). Las células fueron sembradas sobre cristales en placas de 24 pocillos, fijadas en formaldehído al 4% durante 10 minutos y permeabilizadas con Tritón X-100 al 0.5%. Tras ser levantadas con PBS, se incubaron con DAPI (12.5 µg/mL) durante 15 minutos. Finalmente se retiró el exceso de colorante y los cristales conteniendo las células fueron montados en portaobjetos con medio de montaje (Dako Norteamérica Inc., Via Real, CA, EEUU) para su observación. Las imágenes se adquirieron con un microscopio confocal Leica SP2 (Leica Microsystems, Heilderbeg, Alemania) empleando un objetivo 20XPL-APO NA 0.7 de inmersión en glicerol. El DAPI fue excitado con un laser-diodo de 405 nm. Se examinaron 6

campos/muestra con aproximadamente 200 células cada uno a fin de estimar el porcentaje de núcleos con apariencia apoptótica.

3.2.- Citometría de flujo

La cuantificación de células muertas desprendidas al sobrenadante se realizó sobre cultivos de PTEC tratados durante 24 horas con gentamicina (10, 20 y 30 mg/mL) en presencia y ausencia de cilastatina (200 µg/mL). El sobrenadante se recogió en un falcon de 15 mL centrifugándose a 1400 rpm durante 5 minutos recuperándose el pellet de células. Éste se resuspendió en 300 µL de PBS y se analizó en un citómetro de flujo Gallios™ (Beckman Coulter, Madrid, España). Las muestras fueron pasadas a un flujo medio de 60 µL/minuto durante 180 segundos en todos los casos, obteniendo los resultados como el conteo de las células frente a tamaño (FS; forward scatter) y complejidad (SS; side scatter).

3.3.- Enriquecimiento nucleosomal

Para determinar la fragmentación del ADN dentro del contexto de la apoptosis inducida por gentamicina (10, 20 y 30 mg/mL), las PTEC fueron incubadas en presencia y en ausencia de cilastatina 200 µg/mL durante 24 horas en placas de 24 pocillos de 16 mm de diámetro una vez alcanzadas la semiconfluencia. Pasado este tiempo, se lisaron con 200 µL de solución de lisis durante 30 minutos a temperatura ambiente. El lisado obtenido se recogió y se centrifugó a 200 g durante 10 minutos con el fin de retirar los restos celulares.

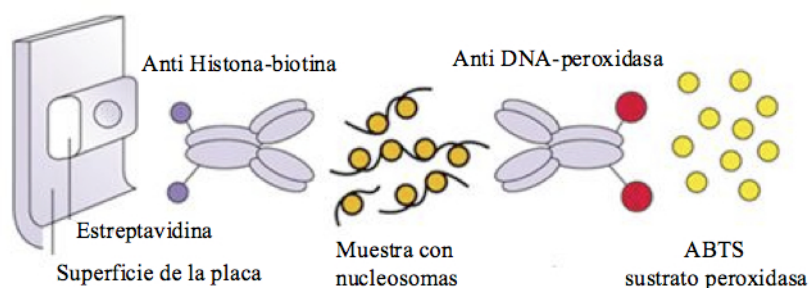


FIGURA 12. Esquema general del procedimiento.

Las histonas y el ADN localizados en los mono y oligonucleosomas en la fracción citosólica de los lisados celulares, se cuantificaron empleando el kit *Cell Death Detection ELISA^{PLUS}* (Boehringer-Mannheim, Roche, Mannheim, Alemania) para medir muerte celular mediante la técnica del ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) siguiendo las instrucciones del fabricante (Figura 12).

3.4.- Determinación de la liberación de lactato deshidrogenasa

La determinación de la liberación de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) es una medida de determinación de muerte celular por necrosis. La presencia de esta enzima en el medio extracelular se debe a que cuando se produce muerte por necrosis, las membranas se fragmentan y liberan el contenido celular al medio externo. Se midió la liberación de LDH desde las PTEC al medio de cultivo tras tratamiento con gentamicina (20 y 30 mg/mL) en presencia y ausencia de cilastatina (200 µg/mL) tras 24 y 48 horas. La concentración de LDH se midió automáticamente con la ayuda de un autoanalizador modular Cobas 711 (Roche Farma, Madrid, España). La liberación de la enzima se expresó en términos relativos con respecto al valor de LDH total liberada por el tratamiento con Tritón X-100 (Sigma) 0.1% (100% de liberación).

4.- Estudios de viabilidad celular

Las células se sembraron en placas de 6 pocillos de 35 mm de diámetro hasta que alcanzaron la semiconfluencia para posteriormente ser tratadas durante 24 horas con gentamicina (20 y 30 mg/mL) en presencia/ausencia de cilastatina (200 µg/mL). Se procedió a levantar las células que todavía quedaban adheridas a las placas con tripsina y se lavaron con medio de cultivo para parar la reacción, centrifugando posteriormente dos minutos a 2000 rpm. Las células se resembraron en placas Petri de 100 mm con medio al 10% SBF dejándolas crecer durante un tiempo de entre 7 y 10 días. Pasado ese tiempo, se retiró el medio de cultivo de las placas y se fijaron con paraformaldehído al 5% durante cinco minutos en PBS y a continuación se tiñeron durante dos minutos con violeta cristal (0.5% violeta cristal en 20% de metanol, Sigma). Tras teñirse las células, se lavó dos veces con PBS y las que quedaron adheridas y teñidas se fotografiaron. Finalmente, el violeta cristal fue eluido con 2 mL de una solución de elución (50% etanol y 50% citrato sódico 0.1M, pH=4.2) cuantificándose su absorbancia a 595 nm.

5.- Estudios de acumulación intracelular de gentamicina

Los cultivos primarios de PTEC fueron sometidos a dosis crecientes de gentamicina (10, 20 y 30 mg/mL) en presencia y ausencia de cilastatina (200 µg/mL) durante 24 horas de tratamiento. Tras la incubación, se añadió a la monocapa 400 µL de buffer de lisis a 70°C [2.22% (p/v) SDS; 19.33% (v/v) glicerol (87% v/v); 177 mM Tris HCl pH 6.8, en agua destilada; fluoruro de metilfenilsulfonilo (PMSF) 0.1 M y cóctel de inhibidor de proteasas (CIP) 10 µL/mL] por placa de 100 mm de diámetro. Se levantaron las células y

se recogió el volumen final obtenido. Éste se sometió a choque térmico, calentándose primeramente durante 5 minutos a 100°C y pasándolo a continuación a hielo. Cada muestra fue sometida a descompresión brusca, y se centrifugaron a 12000 g durante 5 minutos. Finalmente, los sobrenadantes se recogieron y se midió la concentración de proteínas mediante la técnica colorimétrica del BCA (Pierce). Los sobrenadantes se almacenaron a -20°C hasta su análisis.

La determinación de la concentración intracelular de gentamicina en los sobrenadantes se llevó a cabo mediante inmunoensayos o inmunoanálisis de polarización de fluorescencia en un analizador TDX FLx® (ABBOTT Laboratories, EEUU) en el servicio de Microbiología del Hospital General Universitario Gregorio Marañón (HGUGM) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los estándares y controles utilizados en los ensayos eran los propios de cada kit, y el resultado fue expresado como µg gentamicina/µg proteína.

6.- Experimentos en bacterias. Pruebas de sensibilidad bacteriana

Las pruebas de sensibilidad bacteriana se llevan a cabo para medir la sensibilidad de una cepa bacteriana a uno o varios antibióticos, y los experimentos *in vitro* son un requisito previo para la eficacia *in vivo* de un tratamiento antibiótico. 4 cepas bacterianas diferentes de *Staphylococcus aureus* y de *Escherichia coli* provenientes de infecciones en pacientes del HGUGM sensibles a gentamicina, fueron amablemente cedidas por la Dra. Emilia Cercenado del Servicio de Microbiología Clínica de dicho Hospital, para la realización de los estudios de susceptibilidad microbiana. Para ello se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria (-CMI- que es aquella concentración de antimicrobiano que inhibe el crecimiento visible de un microorganismo después de 24 horas de incubación a 35°C), por el método de la microdilución en caldo y posteriormente se determinó la Concentración Mínima Bactericida (-CMB- que se define como la mínima concentración de antimicrobiano que elimina a más del 99,9% de los microorganismos viables después de un tiempo determinado de incubación, generalmente 24 horas) de la gentamicina en presencia y/o ausencia de cilastatina por el método de dilución en agar^{8,67,155}. Para la determinación del CMI, se realizaron para cada cepa de *S. aureus* o *E. coli* diluciones seriadas a la mitad en caldo Mueller-Hinton estéril (BBL™ Mueller Hinton II Broth (Cation-Adjusted); Becton, Dickinson and Company, New Jersey, USA; preparación 22 gramos en un litro de agua destilada) de gentamicina (concentración inicial 64 µg/mL) en presencia o ausencia de cilastatina

(200 µg/mL) en microplacas de 96 pocillos. Las diluciones empleadas de gentamicina fueron por tanto: 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.625 y 0 µg/mL, siendo este último pocillo y concentración el control positivo de crecimiento de las bacterias (Figura 13). Los inóculos bacterianos fueron preparados poniendo colonias aisladas en 5 mL de agua destilada estéril, fabricando una suspensión equivalente a una densidad de 0.5 McFarland (aproximadamente 10^8 unidades formadoras de colonias/mL). 50 µL de estas preparaciones, fueron añadidos a 5 mL de caldo Mueller-Hinton (mantiene el desarrollo del microorganismo) con y sin cilastatina, y de aquí se tomaron 50 µL que fueron añadidos en los pocillos de las placas antes preparadas con el antibiótico. Asimismo se realizaron dos tipos de verificaciones para corroborar que los experimentos se estaban llevando a cabo de manera correcta; la pureza del inóculo, y la concentración del inóculo. Para ver la pureza del inóculo y descartar contaminaciones que interfirieran con los resultados, 10 µL de la mismas preparaciones de inóculos cargadas en la placa fueron sembrados en placas de agar/sangre (BioMérieux, Madrid, España), y para verificar la concentración del inóculo, se transfirieron 10 µL de los pocillos controles positivos de crecimiento, es decir, aquellos donde la concentración de gentamicina era 0 µg/mL, a 5 mL de agua destilada estéril, dilución de la que tras agitar durante 10 segundos se cogieron 100 µL y se sembraron en placas de agar/sangre para el conteo de colonias. Las placas de 96 pocillos, y las placas de agar/sangre con las verificaciones de la pureza y de la concentración del inóculo, fueron incubadas a 35°C durante 24 horas. Al final de este período, se identifica para cada cepa la CMI, y se analizan las placas de las verificaciones de la pureza (observando en las placas que no haya crecimientos ni contaminaciones adicionales de otras especies), y de la concentración por el conteo de las colonias crecidas en las placas.

Para la determinación de la CMB, se extrajo todo el volumen de los cinco pocillos siguientes a la CMI (en los cuales no se observaba crecimiento bacteriano) y se sembraron en placas de agar/sangre, incubándose durante 24 horas a 35°C. Al final del período se contaron las colonias presentes, y se determinó la CMB.

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | |
|---|----|----|----|---|---|---|---|-----|------|-------|-------|----|--------------|
| A | | | | | | | | | | | | | SA / EC 1 |
| B | | | | | | | | | | | | | SA/EC 1+ cil |
| C | | | | | | | | | | | | | SA2/ EC 2 |
| D | | | | | | | | | | | | | SA/EC 2+ cil |
| E | | | | | | | | | | | | | SA/ EC 3 |
| F | | | | | | | | | | | | | SA/EC 3+ cil |
| G | | | | | | | | | | | | | SA/EC 4 |
| H | | | | | | | | | | | | | SA/EC 4+ cil |
| | 64 | 32 | 16 | 8 | 4 | 2 | 1 | 0.5 | 0.25 | 0.125 | 0.625 | 0 | µg/ml |

Figura 13. Esquema general de la preparación de microplacas para la detección de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Mínima Bactericida (CMB) de gentamicina en presencia o ausencia de cilastatina (200 µg/mL) en cepas bacterianas sensibles a gentamicina. Los pasos a seguir para realizar los experimentos son:

- 1º) Añadir 50 µL de caldo Mueller-Hinton con y sin cilastatina a cada pocillo según corresponda desde la columna 2 hasta la 12.
- 2º) Poner 100 µL de la solución de gentamicina en Mueller-Hinton con o sin cilastatina a 64 µg/mL en la columna 1.
- 3º) Pasar 50 µL del antibiótico desde la columna 1 a la 2 mezclando bien, y así sucesivamente hasta la columna 11, desde la que se tiran los últimos 50 µL. La última columna no lleva antibiótico, es el control positivo de crecimiento.
- 4º) Añadir a todos los pocillos y por filas, 50 µL de los diferentes inóculos bacterianos en presencia o ausencia de cilastatina: SA: *Staphylococcus aureus*; EC: *Escherichia coli*; cil: cilastatina. Los números del 1 al 4 representan cepas diferentes.
- 5º) Sembrar 10 µL de cada inóculo bacteriano con o sin cilastatina en placas de agar/sangre para verificar la pureza del inóculo.
- 6º) Sembrar 100 µL de una dilución de 10 µL de cada pocillo de la columna 12 (control positivo de crecimiento) en 5 mL de agua destilada en placas de agar/sangre para verificar la concentración del inóculo.
- 7º) Incubar la placa, así como las placas de agar/sangre de las verificaciones a 35°C durante 24 horas.
- 8º) Calcular la CMI y sembrar todo el volumen de los 5 pocillos siguientes al último con crecimiento bacteriano visible en placas de agar/sangre. Incubar durante 24 horas a 35°C, y contar las colonias para calcular el CMB.

7.- Análisis estadístico

Las variables de interés estudiadas han sido todas cuantitativas continuas, y sus valores se presentan como la media \pm error estándar de la media (EEM). Todas las mediciones se han realizado por duplicado, y cada resultado presentado se ha obtenido en al menos tres preparaciones procedentes de animales diferentes.

Las diferencias han sido consideradas estadísticamente significativas siempre y cuando el estudio presentara un valor de alfa bilateral por debajo de 0.05.

En el caso de que se haya considerado más de un factor, se ha empleado para el análisis un modelo de ANOVA factorial.

Cuando un solo factor presentó más de dos niveles, se empleó un análisis post- hoc (mínima diferencia significativa).

Los efectos de cilastatina sobre las variables modificadas por gentamicina se han evaluado mediante ensayos factoriales de medias repetidas. Los resultados se han analizado mediante un modelo general de ANOVA de dos vías para medidas independientes. Los dos factores habituales en cada estudio han sido el “factor cilastatina”, con dos niveles (sí, no), y el factor “dosis del tóxico”, habitualmente con cuatro niveles correspondientes a las dosis (en tal caso, el ensayo se controlaba con una dosis de “0” en el primer nivel del factor). En los modelos mencionados se ha incluido siempre el factor interacción “cilastatina*dosis del tóxico”, así como un análisis a posteriori de las diferencias entre niveles, utilizando el test LSD (“least significant difference”) como discriminante. Se ha usado un α bilateral de 0.05 como índice de significación. Cuando se han encontrado diferencias significativas para el factor de protección por cilastatina, se ha procurado confirmar dicha diferencia mediante comparación de los ajustes no lineales de las dosis-respuesta correspondientes.

En el caso de datos extremos, se ha considerado como criterio de exclusión la separación de la mediana por más de dos rangos intercuartílicos.

Para comparación de porcentajes se han utilizado tablas de 2 x n, y la significación se ha establecido mediante el test de χ^2 o la proporción exacta de Fisher si no se cumplían las condiciones para aplicar el primero.

V.II.- EXPERIMENTOS *IN* *VIVO*

1.- Modelo de fracaso renal agudo por gentamicina

Para llevar a cabo el modelo experimental *in vivo* (Figura 14), se utilizaron ratas macho de la estirpe Wistar (WKY) con un peso medio de 283 ± 9 g y de entre 7 a 8 semanas de edad, criadas y estabuladas en el animalario del Pabellón de Medicina y Cirugía Experimental del HGUGM.

Tanto el tamaño muestral de los diferentes grupos en estudio como las dosis de los fármacos y los regímenes de los tratamientos fueron obtenidos por revisión bibliográfica y por estudios previos realizados en el laboratorio.

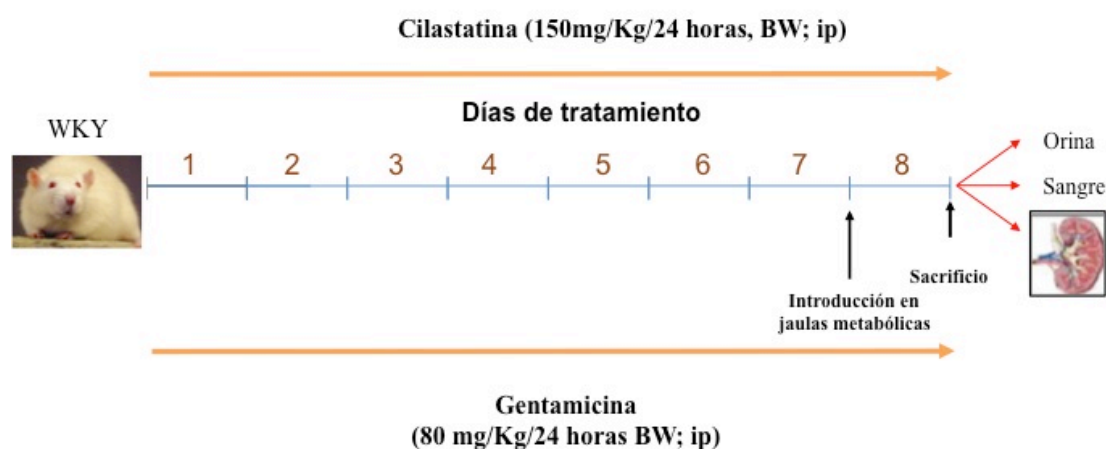
En total fueron necesarios 28 animales, distribuidos de manera aleatoria en los siguientes 4 grupos:

- **Grupo control.** Animales que recibieron suero salino (vehículo de gentamicina y cilastatina) en los mismos volúmenes, tiempos y regímenes que en los grupos tratados con gentamicina y/o cilastatina (n=6).
- **Grupo control + cilastatina.** Animales tratados con administraciones diarias (cada 24 horas) intraperitoneales (i.p.) de suero salino (vehículo de gentamicina) en el mismo volumen que los grupos tratados con gentamicina, más inyecciones de cilastatina a dosis de 150 mg/kg de peso i.p. cada 24 horas desde el momento de la primera administración de suero salino (vehículo de gentamicina) y hasta el momento del sacrificio (n=6).
- **Grupo gentamicina.** Animales tratados con administraciones diarias (cada 24 horas) i.p. de gentamicina (80 mg/kg de peso), más inyecciones de suero salino (vehículo de cilastatina) i.p. cada 24 horas en los mismos tiempos y volúmenes que los grupos tratados con cilastatina (n=8).
- **Grupo gentamicina + cilastatina.** Animales tratados con administraciones diarias (cada 24 horas) i.p. de gentamicina (80 mg/kg de peso) más inyecciones de cilastatina a dosis de 150 mg/kg de peso i.p. cada 24 horas desde el momento de la primera administración de gentamicina y hasta el momento del sacrificio (n=8).

Los animales fueron mantenidos en el estudio durante 8 días desde la primera inyección de gentamicina o su vehículo, teniendo acceso libre a agua y comida (dieta estándar, *ad libitum*) en un ambiente controlado de luz, temperatura y humedad. Un día antes del sacrificio en el noveno día los animales fueron introducidos en jaulas

Materiales y Métodos – Experimentos *in vivo*

metabólicas para poder recoger la orina de 24 horas a fin de cuantificar la diuresis y la concentración de proteínas.



Controles: **Control:** WKY tratada únicamente con suero salino fisiológico en los mismos volúmenes y regímenes que los grupos de gentamicina y gentamicina + cilastatina.
Control + cilastatina

FIGURA 14. Modelo animal de protección por cilastatina frente al fracaso renal agudo tóxico generado por gentamicina. BW: Peso corporal; i.p.: intraperitoneal.

El estudio se llevó a cabo en las instalaciones del animalario del HGUGM tras su aprobación por el Comité Ético de Experimentación Animal, y contó con la supervisión directa del veterinario responsable. Toda la manipulación de animales se llevó a cabo según la normativa legal vigente en el Real Decreto 1201/2005 de 10 de Octubre, sobre la protección de los animales utilizados para la experimentación y otros fines científicos.

2.- Extracción, procesamiento y almacenaje de muestras

En el momento del sacrificio los animales fueron pesados y anestesiados posteriormente con ketamina (10 mg/kg) y diazepam (4 mg/kg). Se procedió a la extracción de sangre mediante canulación de la aorta abdominal a la altura de la bifurcación. Ésta se incubó primero a 37°C durante 30 minutos seguido de una hora a 4°C. Una posterior centrifugación a 2000 rpm durante 15 minutos a 4°C, permitió la obtención del suero sanguíneo, que fue congelado a -80°C hasta el momento de su utilización.

Tras la exanguinación por la aorta abdominal, ésta se clampó cortando su flujo justo por encima de los riñones, se perforó la vena cava inferior y se perfundieron los riñones a través de la cánula con suero salino frío (Braun Medical S.A., Barcelona, España).

Posteriormente los riñones se extrajeron, decapsularon y se mantuvieron en suero salino frío durante su manipulación para minimizar la degradación del tejido.

Los riñones derechos fueron seccionados transversalmente por encima de la arteria renal, introduciendo el polo renal superior en paraformaldehído al 4% en PBS durante 24 horas para su fijación y posterior inclusión en parafina. El resto del riñón junto con la mitad del riñón izquierdo, fue separado en corteza y médula, congelando las muestras en nitrógeno líquido y almacenadas a -80°C hasta el momento de su uso. El resto del riñón izquierdo fue troceado directamente, congelado en nitrógeno y almacenado de la misma manera.

Las muestras renales inmersas en paraformaldehído se fijaron durante 24 horas a 4°C. A continuación se deshidrataron con concentraciones crecientes de etanol y se incluyeron finalmente en parafina en el procesador de tejidos Histolab ZX (especialidades Médicas MYR S.L., Tarragona, España). Las muestras parafinadas se cortaron en un microscopio HM 325 (Microm) en secciones de 4 µm de grosor, que se montaron sobre portaobjetos pretratados con 3-aminopropil-trietoxisilano (APES, Sigma-Aldrich) al 2% en acetona y se almacenaron a temperatura ambiente hasta su utilización para estudios morfológicos e inmunohistoquímicas.

3.- Medida de la proteinuria

La excreción de proteínas en orina de 24 horas se determinó por el método del ácido sulfosalicílico⁵⁵. La orina se recogió gracias a que los animales fueron introducidos en jaulas metabólicas las 24 horas previas al sacrificio.

4.- Determinación de parámetros bioquímicos en suero y orina

Se midieron diferentes parámetros bioquímicos tanto en suero como en orina mediante un autoanalizador Dimension RxL (Dade-Behring, Siemens, Eschborn, Alemania), siguiendo las indicaciones del fabricante. A partir de la obtención de estos datos, se pudieron calcular los principales parámetros de función renal, mediante la utilización de las siguientes fórmulas:

- Carga Urinaria:

$$\text{Carga Urinaria} = ([\text{Na}^+]_{\text{orina}} + [\text{K}^+]_{\text{orina}}) - [\text{Cl}^-]_{\text{orina}}$$

- Aclaramiento de agua libre (ClH_2O):

$$\text{ClH}_2\text{O} = V_{\text{orina}} \times (1 - [\text{Na}^+]_{\text{orina}}) + \frac{[\text{K}^+]_{\text{orina}}}{[\text{Na}^+]_{\text{plasma}}}$$

- Excreción fraccional de agua (EFH_2O):

$$\text{EFH}_2\text{O} = \frac{V_{\text{orina}}}{\text{TGF}} \times 100$$

- Excreción fraccional de sodio (EFNa^+):

$$\text{EFNa}^+ = \frac{[\text{Na}^+]_{\text{orina}} \times [\text{Cr}]_{\text{plasma}}}{[\text{Na}^+]_{\text{plasma}} \times [\text{Cr}]_{\text{orina}}} \times 100$$

- Tasa de filtración glomerular (TFG):

$$\text{TFG} = \frac{[\text{Cr}]_{\text{orina}} \times V_{\text{orina}}}{[\text{Cr}]_{\text{plasma}}} \times 100$$

- Aclaramiento de cloro (ClCl):

$$\text{ClCl} = \frac{[\text{Cl}^-]_{\text{orina}} \times V_{\text{orina}}}{[\text{Cl}^-]_{\text{plasma}}}$$

Na⁺: Ión sodio

Cl⁻: Ión cloro

Cr: Creatinina

K⁺ Ión potasio

V: Volumen

5.- Estudios histopatológicos

Los estudios morfológicos se llevaron a cabo mediante microscopía óptica convencional. Secciones de tejido incluidas en parafina de 4 μm de grosor fueron previamente desparafinadas e hidratadas y se tiñeron con hematoxilina/eosina (Sigma-Aldrich), siguiendo las instrucciones del fabricante.

La valoración del daño renal fue analizada por 2 patólogos del HGUGM, sin conocimiento previo de a qué grupo pertenecía cada una de las muestras. Los parámetros semicuantitativos seleccionados para dichas determinaciones fueron: 0) = sin cambios; 1) = cambios focales afectando a menos del 25% de la muestra; 2) = cambios que afectan entre un 25–50% de la muestra; 3) = cambios que afectan entre 50–75% de la muestra y 4) = daños que afectan a más del 75% de la muestra.

Dicha valoración se aplicó en función del daño glomerular (proliferación de células mesangiales, esclerosis y expansión de la matriz), daño túbulointersticial (dilatación y/o atrofia tubular, necrosis tubular, *bebbling*, presencia de cilindros proteicos intratubulares, mitosis y vacuolización), fibrosis intersticial e infiltrado de células inflamatorias. La puntuación final o “*score*” del daño renal para cada muestra fue el sumatorio de todos los valores obtenidos.

6.- Determinación de la fibrosis tubular

Para la determinación de fibras colágenas en el tejido renal se realizó la tinción de rojo sirio en secciones de 4 μm de tejido incluidos en parafina. Una vez desparafinadas y rehidratadas en concentraciones decrecientes de etanol y lavadas con agua durante 10 minutos, las muestras se tiñeron con rojo sirio (Sirius red F3B 0.5 g (Sigma-Aldrich); en 500 mL de solución acuosa saturada de ácido pícrico) durante 1 hora, la cual da una tinción cercana al equilibrio, que no se ve aumentada al ser expuesta durante tiempos más largos. Posteriormente, los cortes se lavaron 2 veces con agua acidificada para eliminar el exceso de tinción por rojo sirio. A continuación, las muestras se agitaron vigorosamente para retirar la mayor parte de agua acidificada que hubiese podido quedar en los portas e inmediatamente después se deshidrataron en las sucesivas concentraciones crecientes de etanol y se montaron en medio de montaje DPX (EMS, Washington, PA, EEUU).

La valoración de la fibrosis renal fue analizada por 2 patólogos del HGUGM, sin conocimiento previo de a qué grupo pertenecía cada uno de ellos. Los parámetros semicuantitativos seleccionados para dichas determinaciones fueron: 0) = sin cambios;

1) = cambios focales afectando a menos del 25% de la muestra; 2) = cambios que afectan entre un 25–50% de la muestra; 3) = cambios que afectan entre 50-75% de la muestra y 4) = cambios que afectan a más del 75% de la muestra.

7.- Inmunohistoquímica

Para la realización de las inmunolocalizaciones, se utilizaron secciones de 4 µm de tejido incluidos en parafina. En algunos casos, los cortes se calentaron en tampón citrato sódico 10 mM (pH 6.0) durante 10 minutos para desenmascarar el antígeno y facilitar su unión al anticuerpo. Una vez desparafinadas y rehidratadas en concentraciones decrecientes de etanol y desenmascarado el antígeno (en los casos en los que fuera necesario), las secciones se incubaron durante 30 minutos en 3% H₂O₂:metanol (Merck, Darmstadt, Alemania) (1:1) para bloquear la peroxidasa endógena. Posteriormente los cortes se bloquearon 1 hora a temperatura ambiente con una solución de PBS o TBS que contenía albúmina sérica bovina (BSA) al 4% y de suero del huésped en el que se obtuvo el anticuerpo secundario al 8% para eliminar las uniones inespecíficas. Transcurrido ese tiempo, las muestras se incubaron durante toda la noche a 4°C en atmósfera húmeda con los siguientes anticuerpos primarios diluidos en PBS o TBS (según las especificaciones del fabricante) con BSA al 4% y suero del huésped en el que se obtuvo el anticuerpo secundario al 1% (Tabla 5):

| ANTICUERPO | ORIGEN | TAMPÓN CITRATO | DILUCIÓN | CASA COMERCIAL |
|---|--------|-------------------|--------------------|-----------------------------------|
| Monoclonal anti-CD68 (monocito / macrófago) | Ratón | Sí | 1:125 (en PBS) | AbD Serotec (Oxford, Reino Unido) |
| Policlonal anti-caspasa-3 activa | Conejo | No | 1:50 (en TBS) | Cell Signaling BioTechnology |
| Policlonal anti-Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1) | Cabra | Sí | 1:20 (en PBS) | R&D Systems |
| Policlonal anti-megalina | Conejo | Sí | 1:100 (en PBS) | Santa Cruz BioTechnology |
| Policlonal anti-Cu/Zn SOD | Conejo | Sí | 1:1000 (en PBS) | Stressgen |
| Monoclonal anti-4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE) | Ratón | No | 1:75 (en TBS) | Oxis Health Products |
| Policlonal anti-VCAM-1 | Cabra | Sí | 1:100 (en PBS) | Santa Cruz BioTechnology |
| Policlonal anti-TGFβ1 | Cabra | Sí | 1:500 (en PBS) | Santa Cruz BioTechnology |
| Policlonal anti-CTGF | Cabra | Sí | 1:1000 (en PBS) | Santa Cruz BioTechnology |

TABLA 5. Anticuerpos primarios utilizados en inmunohistoquímica.

Tras lavar en PBS o TBS para eliminar los restos de anticuerpo primario, se incubó durante 30 minutos con el correspondiente anticuerpo secundario a temperatura ambiente y posteriormente otros 30 minutos con el *ABC Complex (Kit Vectastain Solution, Vector Labs)*.

Para revelar las inmunolocalizaciones se empleó el cromógeno 3-3'-diaminobencidina (DAB, Sigma-Aldrich) diluido al 0.05% en H₂O₂ 0.03%. Finalmente los tejidos se contrastaron con hematoxilina de Mayer (Sigma-Aldrich), se deshidrataron las muestras y se montaron en DPX (EMS, Washington, PA, EEUU). La especificidad de los anticuerpos primarios se verificó mediante la inclusión de controles negativos, ausentes de anticuerpo primario, obteniendo una ausencia total de señal. La tinción de las inmunohistoquímicas fue evaluada mediante análisis de imagen cuantitativo realizada por el software *Scion Image* (Scion Corporation, Maryland, EEUU) e imágenes digitalizadas. Para cada muestra la media del área de tinción fue obtenida por análisis de ocho campos seleccionados aleatoriamente a una magnificación 20X.

8.- Extracción de proteínas totales

Las muestras de corteza renal o riñón completo que se almacenaron tras la extracción de los tejidos, se pulverizaron con un mortero metálico en presencia de N₂ líquido y se resuspendieron en 1 mL de solución de lisis fría [Tris 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 2 mM, EGTA 2 mM, Tritón X-100 0.2%, NP40 0.3%, CIP 10 µL/mL y PMSF 0.1 mM (1µg/mL)]. A continuación, se mantuvieron a 4°C durante 20 minutos y se colocaron en agitación a la misma temperatura durante otros 30 minutos más. Tras la agitación, las muestras se centrifugaron a 4°C durante 15 minutos a 12000 rpm, recogiendo el sobrenadante donde se localizan los extractos proteicos. Finalmente, la concentración de proteína total en los sobrenadantes se determinó por el método colorimétrico BCA (Pierce, Rockford, EEUU) y se almacenaron a -80°C hasta su utilización.

9.- Western Blot

Los lisados proteicos totales de corteza renal almacenados a -80°C se analizaron por electroforesis (50 µg/muestra) en geles de SDS-poliacrilamida al 12.5-15%, en función del peso molecular de la proteína de interés, en condiciones reductoras. Posteriormente fueron transferidos a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad) en Tris 25 mM pH 8.8, glicina 150 mM y metanol 20% (v/v). Las membranas fueron bloqueadas con leche desnatada en polvo al 5% en PBS o TBS Tween 20 0.1% (PBST o TBST)

Materiales y Métodos – Experimentos *in vivo*

durante una hora e incubadas toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario correspondiente (Tabla 6):

| ANTICUERPO | ORIGEN | DILUCIÓN | PM (KDa) | CASA COMERCIAL |
|---|--------|----------|----------|---------------------------|
| Policlonal anti-procaspasa-3 | Cabra | 1/200 | 32 | Santa Cruz BioTechnology |
| Policlonal anti-caspasa-3 activa | Conejo | 1:1000 | 17, 19 | Cell Signaling Technology |
| Policlonal anti-caspasa-8 activa | Conejo | 1:1000 | 18, 43 | Cell Signaling Technology |
| Policlonal anti-caspasa-9 | Conejo | 1/1000 | 35 | Cell Signaling Technology |
| Policlonal anti-Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1) | Cabra | 1:2000 | 100 | R&D Systems |
| Policlonal anti-Bax | Conejo | 1:500 | 23 | Santa Cruz BioTechnology |
| Policlonal anti-Bcl-2 | Conejo | 1:200 | 26 | Santa Cruz BioTechnology |
| Policlonal anti-Fas/Apo 1 | Conejo | 1:300 | 38 | BioVision |
| Policlonal anti-FasL | Conejo | 1:200 | 26 | Santa Cruz Biotechnology |
| Policlonal anti-HSP-27 | Cabra | 1:200 | 27 | Santa Cruz Biotechnology |
| Policlonal anti-HSP-70 | Ratón | 1:1000 | 70 | Stressgen |
| Policlonal anti-catalasa | Cabra | 1:1000 | 64 | Santa Cruz Biotechnology |
| Policlonal anti-Cu/Zn SOD | Conejo | 1:4000 | 16 | Stressgen |
| Policlonal anti-β-actina | Ratón | 1:5000 | 42 | Sigma Aldrich |

TABLA 6. Anticuerpos primarios utilizados en Western Blot. PM: Peso molecular.

Tras sucesivos lavados para eliminar el exceso de anticuerpo primario, se incubaron con los correspondientes anticuerpos secundarios (Tabla 7) conjugados con peroxidasa una hora a temperatura ambiente:

| ANTICUERPO | ORIGEN | DILUCIÓN | CASA COMERCIAL |
|--------------------------------------|--------|----------|--------------------------|
| Policlonal anti-IgG de ratón | Oveja | 1:5000 | Amersham |
| Policlonal anti-IgG de cabra | Burro | 1:5000 | Santa Cruz BioTechnology |
| Policlonal anti-IgG de conejo | Burro | 1:5000 | Amersham |

TABLA 7. Anticuerpos secundarios utilizados en Western Blot.

Una vez llevada a cabo la incubación con el anticuerpo secundario, se lavó sucesivamente con PBST o TBST para eliminar el exceso de anticuerpo y se identificaron las proteínas mediante quimioluminiscencia (ECL, Amersham Pharmacia Biotech.), con ayuda de un revelador Alliance 4.7 (Uvitec, Cambridge, Reino Unido).

Las cuantificaciones de las señales se obtuvieron con el programa de análisis *Image J* (*Image Processing and Analysis in Java*) (<http://rsbweb.nih.gov/ij/index.html>). Los resultados obtenidos se expresaron en unidades arbitrarias de densitometrado (u.a.d.).

10.- Determinación de proteínas en suero y orina

La determinación de la concentración de MCP-1 y TGF β en suero y/o orina se realizó mediante el sistema Bio-Plex®200 (BioRad) en el laboratorio del Dr. Bonventre, donde se han desarrollado y validado todos los ensayos basados en microesferas¹³⁵. Los ensayos consisten en aproximadamente 6000 esferas (conjugados con los respectivos anticuerpos de captura para cada una de las citoquinas o proteínas ensayadas) en 50 μ L de solución diluyente estéril (0.1M HEPES, 0.1M NaCl, 0.1% Tween-20 y 1% BSA; pH 7.4) con 30 μ L de las muestras o con las proteínas recombinantes correspondientes a cada proteína ensayada (R&D Systems, Minneapolis, EEUU) durante 45 minutos. Tras la incubación, las esferas son lavadas 3 veces con PBST e incubadas con los correspondientes anticuerpos biotinilados para su detección (R&D Systems) durante 30 minutos. Las esferas son lavadas de nuevo con PBST e incubadas durante 15 minutos con una solución de estreptavidina-PE (Invitrogen). La señal procedente del fluorocromo, que es directamente proporcional a la cantidad de antígeno unido a la superficie de las microesferas, fue capturada utilizando el sistema Bio-Plex (BioRad). Los datos obtenidos son generados e interpretados utilizando diferentes análisis de regresión logística paramétrica.

11.- Ensayo de TUNEL

El ensayo de TUNEL (*terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated DUTP nick end labeling*) se realizó en tejido incluido en parafina usando el kit *Fluorescein FragEL™ DNA fragmentation* (Calbiochem, Darmstadt, Alemania), siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Secciones de tejido renal de 4 μ m de grosor, tras ser desparafinadas y rehidratadas, fueron tratadas con 20 μ g/mL de proteinasa K durante 20 minutos y lavadas con TBS 1X. Se sumergieron los cortes en tampón de equilibrado y se incubaron durante 90

minutos a 37°C con la mezcla de reacción conteniendo la enzima. Tras los sucesivos lavados para eliminar el exceso de señal, los cortes fueron contrateñidos con DAPI y montados en portaobjetos con el medio de montaje proporcionado por el kit. Fueron necesarios controles negativos que consistieron en la sustitución de la enzima por agua destilada en la mezcla de reacción.

Para la visualización y cuantificación de los resultados obtenidos, se empleó un microscopio confocal Leica SP-2 (Leica Microsystems). La cuantificación se realizó en ciego, contando las células fluorescentes TUNEL-positivas en 6 campos diferentes tomados al azar de cada preparación. El resultado final se expresó como células TUNEL-positivas/mm².

12.- Extracción de ARN total de corteza renal

Las muestras de corteza renal congeladas se pulverizaron con un mortero metálico en presencia de N₂ líquido y se resuspendieron en 1 ml de reactivo comercial Trizol™ Reagent (Life Technologies, Invitrogen, Paisley, Reino Unido). Para la extracción del ARN total se siguieron las indicaciones del fabricante, manteniendo los homogeneizados cinco minutos a temperatura ambiente con el fin de permitir la completa disociación de los complejos núcleo-proteicos. Posteriormente se añadieron 200 µL de cloroformo por muestra agitándose los tubos vigorosamente durante 15 segundos, incubando después durante 2-3 minutos a temperatura ambiente. Los tubos se centrifugaron a 11400 rpm, 20 minutos a 4°C, separándose 3 fases; la de cloroformo-fenol; la interfase y la acuosa. Esta última se transfirió a nuevos tubos y se añadieron en ellos 500 µL de isopropanol para acto seguido agitar y mezclar los líquidos. Se incubaron las mezclas a temperatura ambiente y se centrifugaron a 12000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Los sobrenadantes fueron desechados y se conservó el pellet, al que se le añadió 1 mL de etanol al 75% mezclándose vigorosamente, y se centrifugó a 8700 rpm durante 5 minutos a 4°C. El sobrenadante obtenido se decantó añadiendo al pellet 1 mL de etanol 100%, procediendo de la misma manera que en el caso anterior. Finalmente, se decantó el sobrenadante y el pellet se dejó secar resuspendiéndolo posteriormente en 10-12 µL de agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC).

La cuantificación de la concentración de ARN de las muestras fue realizada por la medida de la absorbancia a 260 nm con ayuda de un Nanodrop (Nucliber), considerando que 1 unidad de absorbancia corresponde a 40 µg/mL de ARN. Se obtuvo la pureza de los extractos a través de la medida de la relación entre absorbancias a 260 y 280 nm,

observando que esta relación era cercana a 2, lo que implicaba ausencia de contaminación por proteínas en las muestras.

13.- PCR en tiempo real

Para la realización de esta técnica fue necesario convertir el ARN obtenido como se ha indicado en el punto anterior en ADNc (transcripción inversa). Para ello se utilizaron 2 µg de ARN y se utilizó el kit comercial *iScript cDNA Synthesis Kit* (Bio-Rad), de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. La cuantificación de la concentración de ADNc se calculó con ayuda de un nanofotómetro (Implen, Schatzbogen, Múnich, Alemania).

La PCR en tiempo real se realizó mediante el sistema de detección secuencial *iQ5 Multicolor Real Time PCR Detection System* (Bio-Rad). Se realizó la amplificación del ADNc del gen de interés junto con la de las enzimas gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) o *18S ribosomal RNA* que se emplearon como *house-keeping* o control interno. Tanto los cebadores como el *house-keeping* se obtuvieron por revisión bibliográfica. Todas las medidas se obtuvieron por duplicado. Los genes ensayados y los cebadores empleados en su análisis se recogen en la Tabla 8.

| GEN | SECUENCIA (SENTIDO) | SECUENCIA (ANTISENTIDO) |
|-----------------|-------------------------------|-------------------------------|
| 18S | GAC TCA ACA CGG GAA ACC TC | AGA CAA ATC GCT CCA CCA AC |
| Fas | CTG TGA TGA AGG GCA TGG TT | ATT TGG TGT TGC TGG TTC GT |
| Fas-L | GGG ATC TGG TGC TAA TGG AG | AAA TGG TCA GCA ACG GTA AGA |
| GAPDH | AAA CCC ATC ACC ATC TTC CA | GTG GTT CAC ACC CAT CAC AA |
| IL-1β | CAC CTC TCA AGC AGA GCA CAG | GGG TTC CAT GGT GAA GTC AAC |
| IL-6 | GTC AAC TCC ATC TGC CCT TC | ACT GGT CTG TTG TGG GTG GT |
| KIM-1 | TTC AAG TCT TCA TTT CAG GCC | CTG CTC CGA TAG GTG ACT TGG |
| MCP-1 | GTC ACG CTT CTG GGC CTG TTG T | TCT CTG TCA CGC TTC TGG GCC T |
| Megalina | GAC AAC ATC ACT GCC CAC AC | CAC TCC AGA AGA CAC GAC CA |
| TGFβ | CAA TTC CTG GCG TTA CCT TG | AGC CCT GTA TTC CGT CTC CT |
| TNFα | GAT CCG AGA TGT GGA ACT GG | CGA GCA GGA ATG AGA AGA GG |

TABLA 8. Genes ensayados y cebadores empleados en la técnica de PCR en tiempo real.

14.- Determinación de la capacidad antioxidante

La determinación de la capacidad antioxidante se llevó a cabo en la orina de los animales mediante el uso del kit comercial *Oxiselect Total Antioxidant Capacity Assay Kit* (Cell Biolabs, San Diego, CA, EEUU) siguiendo las indicaciones del fabricante.

Las muestras (20 μ L) se mezclaron con 180 μ L del búfer de reacción previamente diluido en PBS 1X (1:100). Se procedió a leer la absorbancia inicial (490 nm) para poder calcular la absorbancia neta al sustraerla con respecto a la absorbancia final. Tras la lectura de la absorbancia inicial, se añadieron 50 μ L de del reactivo de ion cobre agitándose durante 5 minutos. La reacción fue detenida mediante la adición de 50 μ L de la solución de parada y se procedió a la lectura de la absorbancia final a 490 nm.

La capacidad antioxidante se calculó comparando los valores de absorbancia neta de las muestras obtenidas por duplicado con la curva estándar, extrapolando en la recta y se expresó en mM.

15.- Determinación del factor de necrosis tumoral α

La concentración de TNF α se determinó en los sueros obtenidos mediante el kit *Rat TNF α ELISA Kit* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EEUU), siguiendo las indicaciones del fabricante. La cuantificación del TNF α de las muestras se obtuvo por interpolación de la diferencia de las absorbancias a 450 nm y 550 nm en una curva estándar generada con los estándares proporcionados por el kit, expresándose el resultado final en pg/mL.

16.- Acumulación de gentamicina en tejido renal

En los extractos proteicos de riñón total obtenidos según el procedimiento descrito en el apartado 8 de *Materiales y métodos*, se determinó la concentración intracelular de gentamicina mediante inmunoanálisis de polarización de fluorescencia en un analizador TDX FLx® (ABBOTT Laboratories, EEUU) en el servicio de Microbiología del HGUGM de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los estándares y controles utilizados en los ensayos eran los propios de cada kit, y el resultado fue expresado como μ g gentamicina/ μ g proteína.

17.- Análisis estadístico

En la realización del estudio estadístico de los datos obtenidos para los distintos grupos a lo largo de todo el modelo, se empleó el test de Levene para calcular la igualdad de varianza. Las variables continuas que presentaban igualdad de varianza y una distribución normal, se analizaron mediante el test de ANOVA de una vía. Los resultados fueron expresados como *media \pm EEM*. Valores de $p \leq 0.05$ fueron considerados

Materiales y Métodos – Experimentos *in vivo*

significativos. No fue necesario el uso de test no paramétricos. Todos los test estadísticos se realizaron utilizando el software informático SPSS.

VI.- RESULTADOS

VI.1.- RESULTADOS MODELO *IN VITRO*

1.- La cilastatina como agente nefroprotector

Todos los estudios *in vitro* realizados se llevaron a cabo con cultivos primarios de PTEC que reproducen las características de las células en el riñón como la presencia del borde del cepillo, transporte polarizado de agua y solutos, etc. Se pretendió ver si cilastatina presentaba algún efecto en la dinámica de crecimiento, morfología de la monocapa o si en general, su mera presencia provocaba algún tipo de cambio con respecto a las células del túbulo proximal exentas de agresión.

1.1.- Estudios en la dinámica de crecimiento celular

Anteriormente en nuestro laboratorio se demostró que cilastatina es completamente inocua a las PTEC¹²³. Para ello, se realizó un experimento de dinámica de crecimiento del cultivo, que está caracterizado por una primera fase de adhesión de las células a la placa de cultivo (2-3 días tras la siembra), una fase de crecimiento exponencial (días 4-9), una fase estacionaria tras alcanzar la confluencia (día 12) y finalmente senescencia (Figura 15).

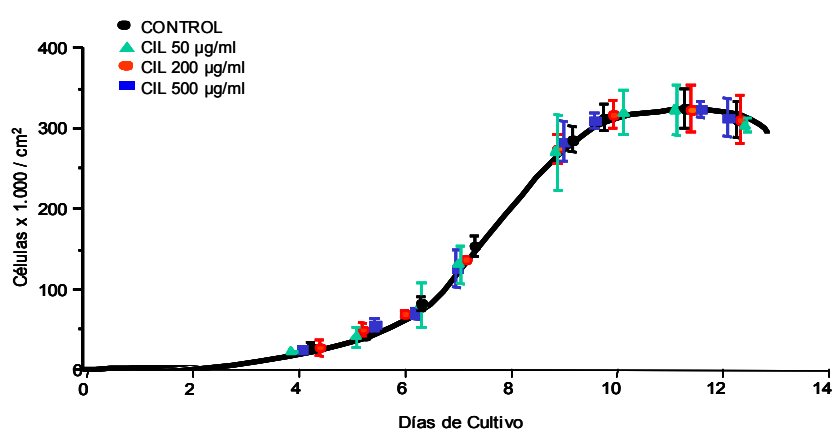


FIGURA 15. Dinámica de crecimiento en cultivos de PTEC en presencia de cilastatina 50, 200 y 500 µg/mL. Cilastatina no influyó en el crecimiento celular. La cuantificación se llevó a cabo en un microscopio de contraste de fases. Magnificación 40X. Cil: cilastatina.

Las características de dinámica celular tanto en presencia como en ausencia de cilastatina, ponen de manifiesto que a las dosis de fármaco tratadas (desde la dosis terapéutica y hasta la más alta alcanzada en sangre) no hay cambios, y que por tanto, en células del epitelio proximal, cilastatina no ejerce ninguna acción nociva ni beneficiosa para el crecimiento de dichas células.

2.- Efecto de gentamicina. Acción de cilastatina

2.1.- Morfología celular

El tratamiento con gentamicina provoca muerte celular en un proceso dosis-dependiente. Al estudiar por microscopía de contraste de fases la evolución morfológica de las PTEC tras 24 horas de exposición a gentamicina, se observa como dichas células comienzan a desprenderse (en condiciones normales son células adherentes) y adoptan una morfología redondeada característica de los procesos de muerte celular. Cuando éstas se coincubaban con cilastatina durante el mismo tiempo, las células permanecen en su mayoría aun adheridas y sin daño morfológico visible y por tanto permite que se llegue a la semiconfluencia (Figura 16).

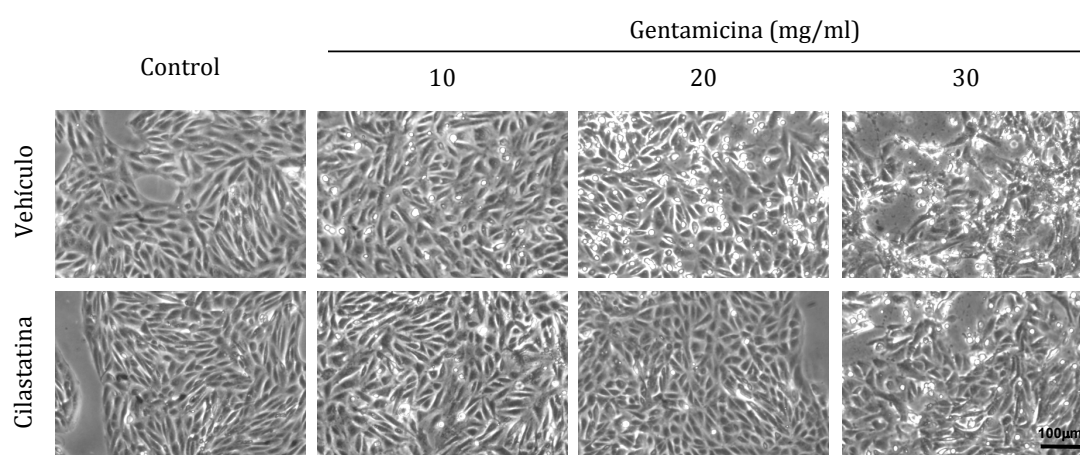


FIGURA 16. Efecto de la cilastatina en la morfología de las células epiteliales tubulares proximales (PTEC) tras tratamiento con gentamicina. Se trataron PTEC con gentamicina a las concentraciones de 10, 20 y 30 mg/mL en presencia o ausencia de cilastatina (200 µg/mL) durante 24 horas. Las células que no se trataron con cilastatina mostraron un claro desprendimiento al sobrenadante y consecuente muerte celular. Magnificación 40X.

Para corroborar los resultados obtenidos, se recogieron las células desprendidas al sobrenadante y se procedió al conteo de las mismas mediante citometría de flujo obteniendo los resultados mostrados a continuación (Figura 17).

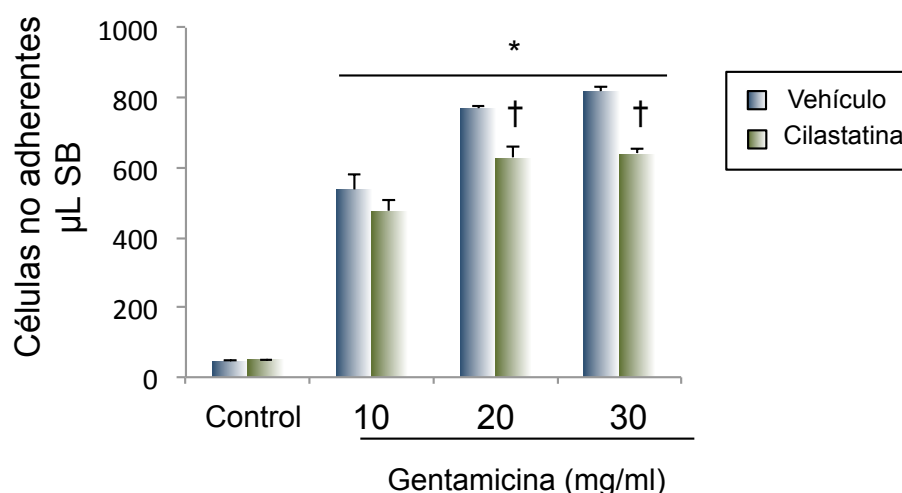


FIGURA 17. Cuantificación mediante citometría de flujo de células desprendidas en el sobrenadante. La cuantificación se realizó a diferentes concentraciones de gentamicina (10, 20 y 30 mg/mL) en presencia o ausencia de cilastatina (200 µg/mL) tras 24 horas de tratamiento observándose que el desprendimiento celular es directamente proporcional a la concentración de fármaco suministrada. Se observó una recuperación significativa de las células en tratamientos con gentamicina combinados con cilastatina. Los datos se representan como la media \pm EEM de 3 experimentos. * $p \leq 0.0001$ vs. Control y control + cilastatina, † $p \leq 0.0001$ vs. mismos datos sin cilastatina. SB: sobrenadante.

2.2.- Medidas de muerte celular por apoptosis

Para corroborar los resultados anteriores que parecen indicar que cilastatina estaría protegiendo de la muerte celular, realizamos experimentos orientados a analizar si esta protección tendría que ver con la interferencia de la muerte celular por apoptosis.

2.2.1.- Efecto de cilastatina sobre la aparición de alteraciones nucleares

Durante el proceso de apoptosis es frecuente la aparición de alteraciones morfológicas en el núcleo, como la condensación de la cromatina o la fragmentación nuclear. Cultivos de PTEC se tiñeron con DAPI, fluoróforo intercalante con el ADN y que por tanto tiñe los núcleos, y se observaron al microscopio confocal. Los resultados mostraron que las células tratadas con gentamicina presentaban núcleos claramente apoptóticos aumentando su número a medida que aumentaba la concentración de gentamicina. Cilastatina sin embargo, fue capaz de reducir en gran medida la fragmentación nuclear como puede observarse en la Figura 18A. Las imágenes se corroboraron mediante la cuantificación de células con el núcleo alterado (Figura 18B).

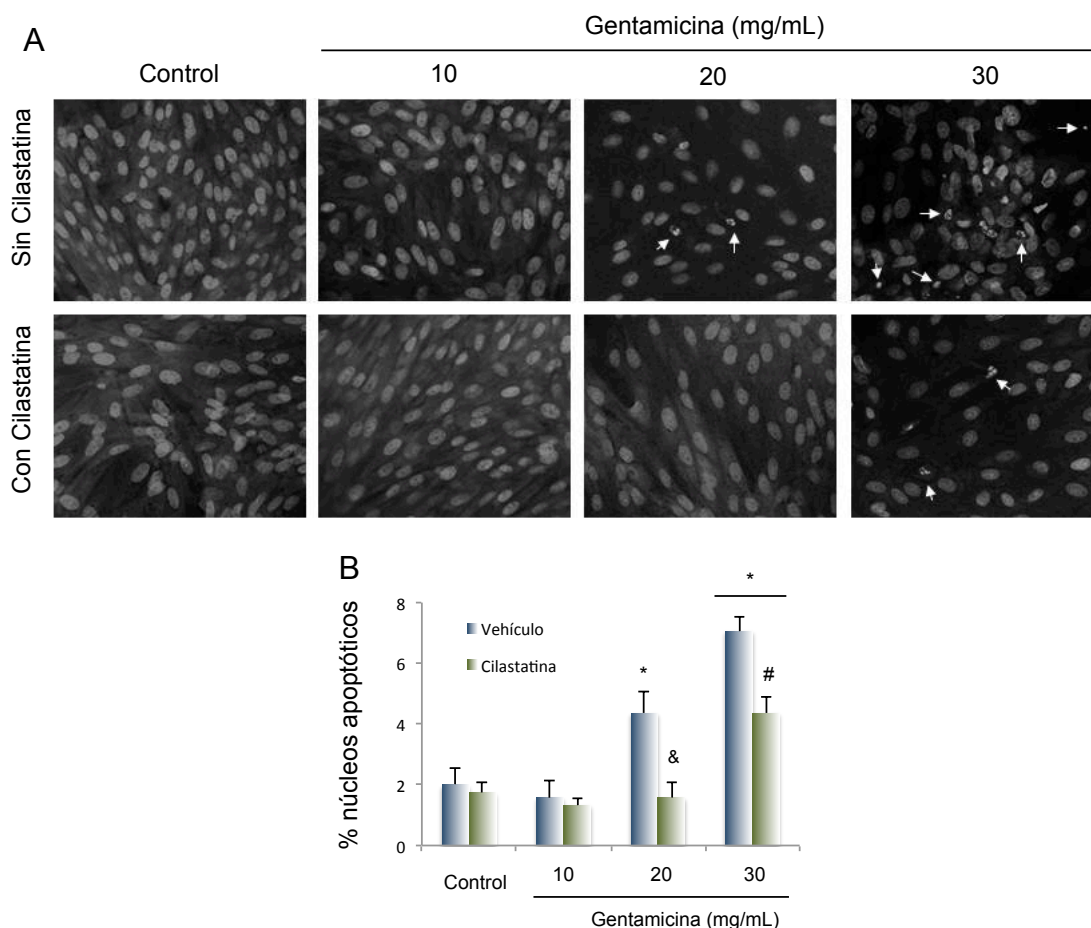


FIGURA 18. Efecto de cilastatina sobre las alteraciones nucleares producidas por gentamicina. A) Tinción nuclear con DAPI. Células tubulares proximales tratadas con gentamicina 10, 20 y 30 mg/mL en presencia/ausencia de cilastatina (200 μ g/mL) durante 24 horas fueron teñidas con DAPI y observadas al microscopio confocal. Las células tratadas únicamente con gentamicina 20 y 30 mg/mL mostraron un mayor número de núcleos apoptóticos con respecto a los controles. El tratamiento con cilastatina a esas dosis redujo el número de núcleos apoptóticos significativamente. Las flechas indican la presencia de núcleos con morfología apoptótica. B) Cuantificación de núcleos apoptóticos. Los resultados se expresan como porcentaje de núcleos con apariencia apoptótica con respecto al total. Los datos se expresan como la media \pm EEM de 3 experimentos independientes. * $p \leq 0.005$ vs control y control + cilastatina, & $p \leq 0.001$ vs mismo dato sin cilastatina y # $p \leq 0.002$ vs mismo dato sin cilastatina.

2.2.2.- Efecto de cilastatina en el enriquecimiento nucleosomal

A consecuencia de la fragmentación del ADN durante el proceso de apoptosis, se liberan los nucleosomas al citosol. En la Figura 19 se representa la fragmentación nucleosomal tras 24 horas de tratamiento con gentamicina en presencia o ausencia de cilastatina. Se produce un incremento dosis-dependiente de dicha liberación de nucleosomas al citosol que está significativamente disminuido en aquellos casos en los que las células son tratadas conjuntamente con cilastatina.

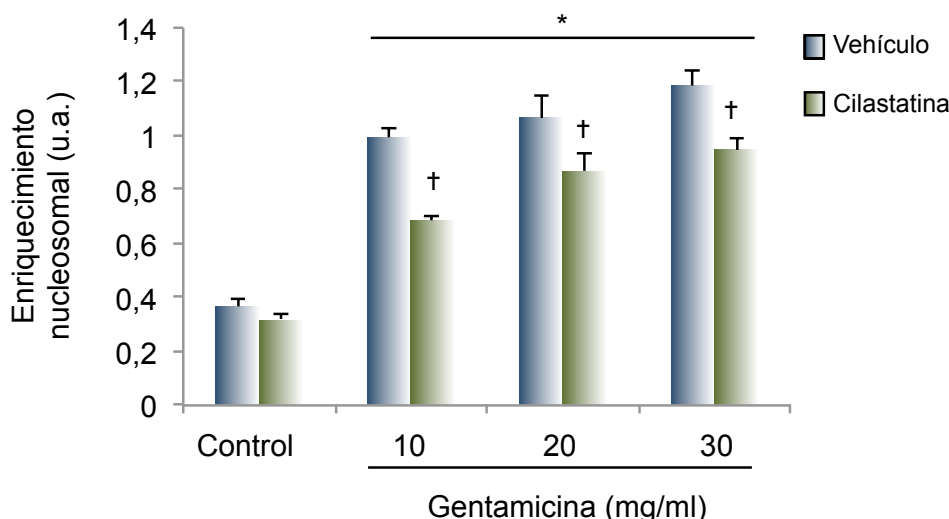


FIGURA 19. Efecto de cilastatina sobre el enriquecimiento nucleosomal en células tratadas con gentamicina. Los oligonucleosomas presentes en la fracción soluble de las células tras 24 horas de tratamiento con gentamicina (10, 20 y 30 mg/mL) y/o cilastatina (200 µg/mL) fueron detectados mediante un ensayo ELISA. El tratamiento con cilastatina redujo la aparición de nucleosomas inducida por gentamicina. Los datos se expresan como la media ± EEM de 4 experimentos independientes. * $p \leq 0.001$ vs control y control + cilastatina, † $p \leq 0.02$ vs los mismos datos sin cilastatina. u.a.: unidades arbitrarias.

2.3.- Efecto de cilastatina en la viabilidad celular

Los estudios morfológicos y de medida de muerte celular anteriores, demuestran que cilastatina era capaz de reducir las alteraciones generadas por gentamicina, por lo que a continuación decidimos estudiar si además de proteger, también era capaz de conferir a las células mayor capacidad de regeneración. Para ello, se realizó un experimento de viabilidad celular utilizando violeta cristal como agente intercalante con el ADN en PTEC tratadas durante 24 horas con gentamicina en presencia y ausencia de cilastatina. Los resultados obtenidos en la Figura 20A y cuantificados en la Figura 20B mostraron un descenso significativo y dosis-dependiente del número de unidades formadoras de colonias tras tratamiento con gentamicina. Se puede observar cómo la coadministración de cilastatina es capaz de preservar parcialmente la viabilidad celular, aumentando claramente el número de células con capacidad proliferativa después de 7 días de recuperación a cada concentración de gentamicina estudiada.

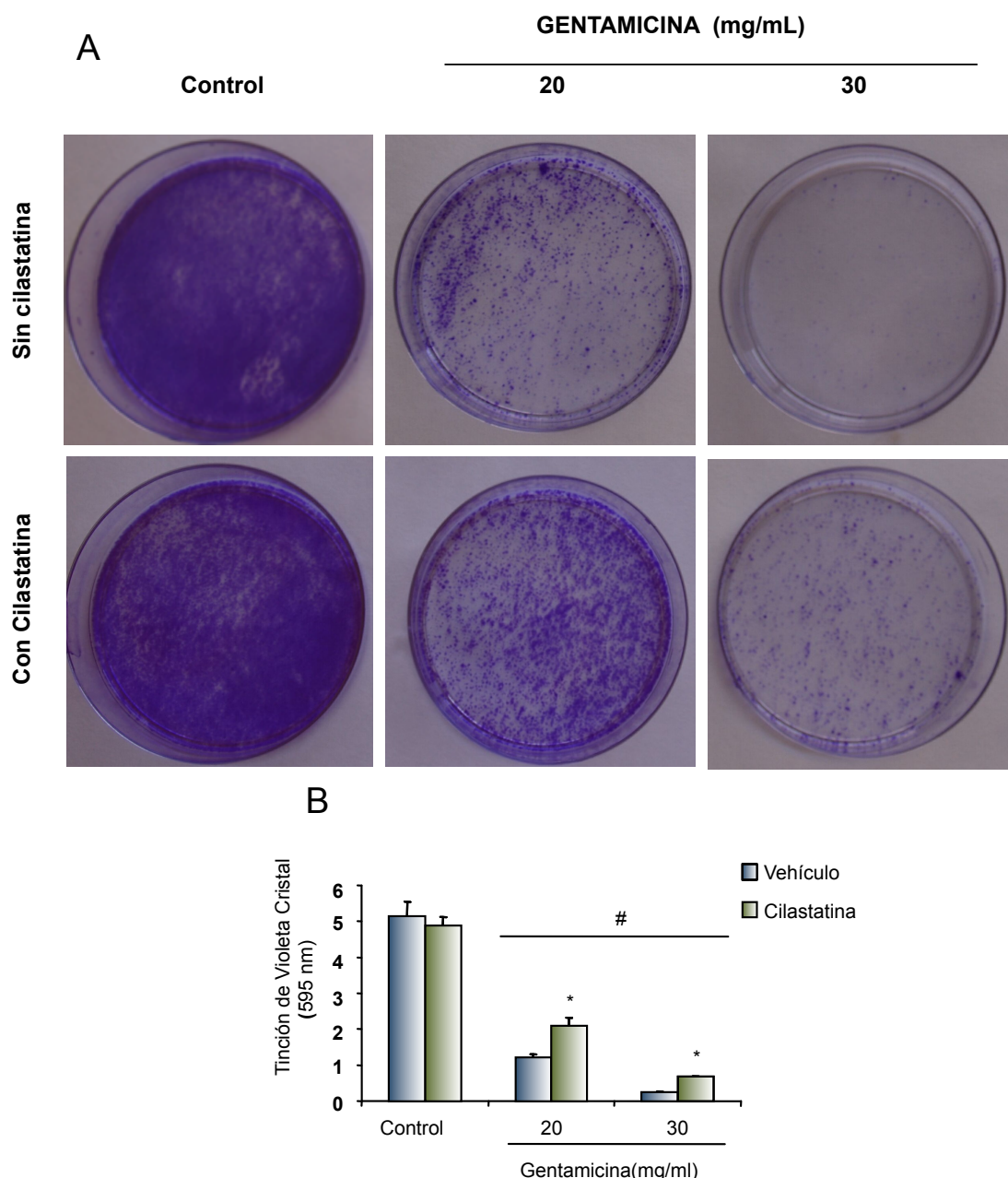


FIGURA 20. Efecto de cilastatina sobre la viabilidad de las células tubulares proximales (PTEC) tratadas con gentamicina. A) Imágenes representativas de la tinción de PTEC viables usando violeta cristal como agente intercalante. B) Cuantificación espectrofotométrica de dicha tinción a 595 nm. Se observa una recuperación parcial del número de células proliferativas en presencia de cilastatina. Los datos se expresan como la media \pm EEM para los 3 experimentos independientes. * $p \leq 0.05$ vs mismos datos sin cilastatina, # $p \leq 0.05$ vs control y control + cilastatina.

2.4.- Medida de muerte celular por necrosis

Como ya se explicó en la *Introducción*, gentamicina puede producir muerte celular por apoptosis pero también puede hacerlo por necrosis. Para analizar si cilastatina ejercía alguna acción protectora ante esta forma de muerte, se estudió la liberación de LDH al medio de cultivo tras tratamiento de las PTEC con gentamicina en presencia y ausencia de cilastatina tras 24 y 48 horas. Se consideró el 100% de liberación de LDH la

producida por tratamiento con el detergente Tritón X-100. Los resultados obtenidos en la Figura 21, muestran que la muerte celular por necrosis producida por gentamicina es tiempo-dependiente ya que tras 24 horas de tratamiento solo se produjo un 20% de liberación de LDH mientras que tras 48 horas la muerte por necrosis afectó al 80% de las células. Cilastatina no tuvo ningún efecto sobre la muerte por necrosis ya que no consiguió reducir los niveles de liberación de LDH con respecto a las PTEC tratadas únicamente con gentamicina.

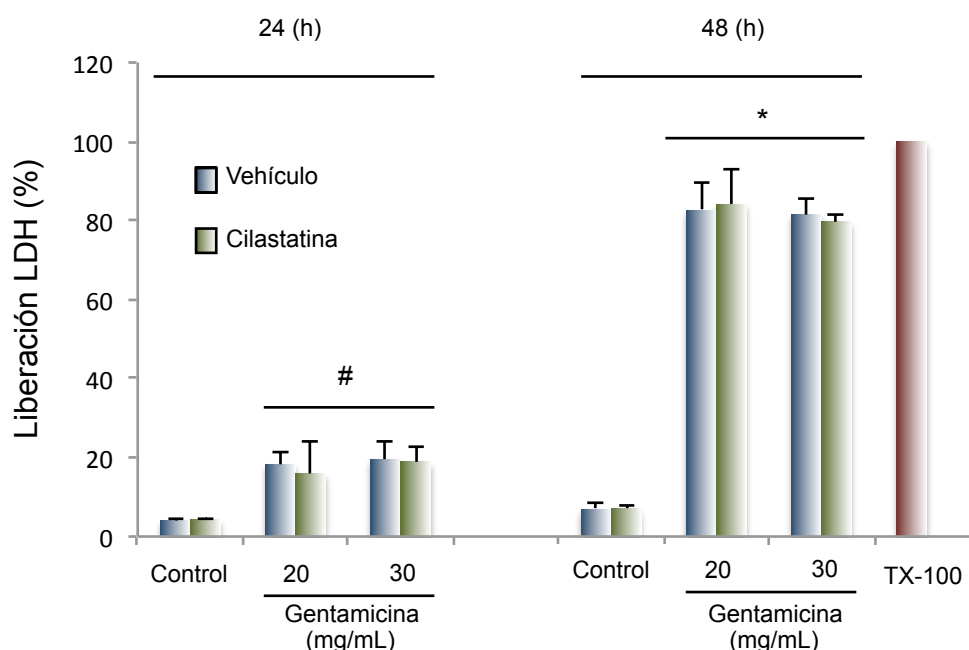


FIGURA 21. Efecto de cilastatina sobre la necrosis inducida por gentamicina en células tubulares proximales epiteliales. Los datos obtenidos se representan como porcentaje de liberación de lactato deshidrogenasa (LDH), considerando dicha liberación como 100% cuando las células son tratadas con Tritón X-100 (TX-100). Los datos se expresan como la media \pm EEM de 3 experimentos independientes. # $p \leq 0.01$ vs control y control + cilastatina, * $p \leq 0.0001$ vs control y control + cilastatina.

2.5.- Efecto de cilastatina en la acumulación intracelular de gentamicina

La nefrotoxicidad generada por gentamicina está asociada al daño de las PTEC y depende principalmente de la concentración intracelular de manera dosis-dependiente. La Figura 22 muestra la acumulación de gentamicina en las PTEC a diferentes concentraciones de gentamicina en presencia y/o ausencia de cilastatina. Se observa como la concentración intracelular del antibiótico aumenta de manera dosis-dependiente, como era esperable. El cotratamiento con cilastatina durante 24 horas bloquea parcial y significativamente la acumulación de gentamicina en las células.

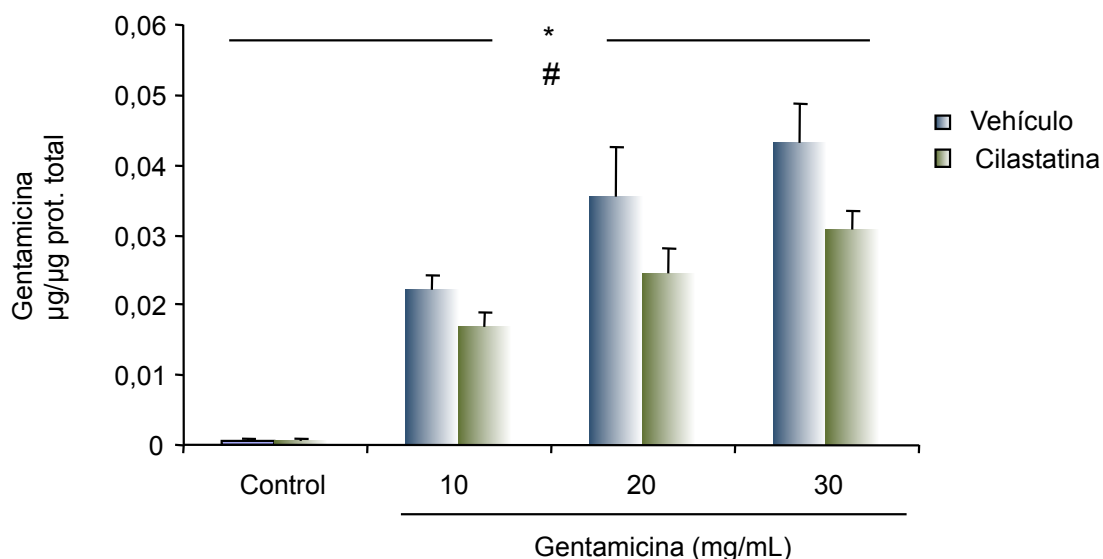


FIGURA 22. Efecto de cilastatina en la acumulación de gentamicina en la fracción soluble de las células proximales tubulares (PTEC). Se trataron PTEC a distintas dosis de fármaco nefrotóxico (10, 20 y 30 mg/mL) en presencia y/o ausencia de cilastatina (200 µg/mL) durante 24 horas y se midió la concentración de gentamicina en µg/µg de proteína total en la fracción soluble celular por inmunoanálisis de polarización de fluorescencia. Se observa que los tratamientos con cilastatina reducen la entrada de gentamicina a las distintas dosis de fármaco de manera significativa. Los resultados se expresan como la media ± EEM de 4 experimentos. ANOVA: $p < 0.0001$ para el modelo; * efecto cilastatina $p \leq 0.05$ y # efecto dosis $p \leq 0.05$.

VI.II.- RESULTADOS MODELO *IN VIVO*

1.- Modelo animal de fracaso renal agudo inducido por gentamicina. Protección con cilastatina

Dados los resultados obtenidos anteriormente, cilastatina es capaz de bloquear la entrada de gentamicina a las PTEC y de este modo disminuir su nefrotoxicidad. No obstante, en el FRA observado en animales, tienen lugar fenómenos inflamatorios, oxidativos y vasculares que no pueden ser estudiados en su conjunto *in vitro* y que sin duda han de ser considerados a fin de conocer el verdadero efecto protector de cilastatina frente al nefrotóxico empleado. Por este motivo, se diseñó un modelo animal en ratas Wistar de nefrotoxicidad generada por gentamicina.

1.1.- Cilastatina disminuye la pérdida de peso corporal

Como fue comentado en el apartado de *Materiales y Métodos*, el modelo animal de nefrotoxicidad se dividió en cuatro grupos: Control; Control + Cilastatina; Gentamicina y Gentamicina + Cilastatina. En él, los animales fueron inyectados i.p. con dosis de 80 mg/kg día de gentamicina y en aquellos en los que procedía, con cilastatina 150 mg/kg día durante 8 días. A lo largo del ensayo, se obtuvieron los pesos de los animales, calculando la diferencia de su peso al inicio y al final del estudio. Los resultados expuestos en la Tabla 9, mostraron que los animales del grupo control y los que recibieron únicamente cilastatina vieron aumentado su peso entre un 4% - 5%. Sin embargo, los animales tratados con gentamicina finalizaron el estudio con una ligera disminución de su peso corporal, correspondiente al 1% pero significativa con respecto a los controles. Finalmente, el grupo tratado con gentamicina y cilastatina vio aumentado su peso corporal en un 2% que fue significativamente distinto a la del grupo tratado únicamente con gentamicina.

| GRUPO | PESO INICIAL | PESO FINAL | Δ PESO |
|---------------------------|--------------|------------|----------|
| Control | 296 ± 12 | 312 ± 10 | 16 ± 3 |
| Control + Cilastatina | 287 ± 8 | 299 ± 8 | 12 ± 2 |
| Gentamicina | 268 ± 9 | 265 ± 9 | -3 ± 2 * |
| Gentamicina + Cilastatina | 283 ± 9 | 288 ± 5 | 5 ± 3 †# |

TABLA 9. Diferencia de pesos al inicio y final del estudio. Los animales de los grupos control, control + cilastatina y gentamicina + cilastatina ganaron peso con respecto al día de inicio del estudio. El grupo gentamicina sufrió una pérdida de peso corporal de 1%. Los datos representan la media ± EEM, n=6-8 animales por grupo. *p ≤ 0.01 vs control y control + cilastatina; †p ≤ 0.05 vs control; # p ≤ 0.05 vs gentamicina.

1.2.- Cilastatina recupera la función renal

El estudio de la función renal fue analizado mediante la determinación de parámetros bioquímicos en sueros y orinas y mediante estudios histológicos.

1.2.1.- Parámetros bioquímicos en sangre

Fueron muchos los parámetros bioquímicos analizados para comprobar la recuperación renal en presencia de cilastatina. La Figura 23 muestra los principales indicadores de la función renal utilizados en clínica: creatinina, nitrógeno ureico en sangre (NUS) y aclaramiento de creatinina. En los animales del grupo gentamicina, la creatinina sérica y el NUS quedaron aumentados significativamente frente a los grupos control, mientras que el cotratamiento con cilastatina disminuyó de manera significativa dichos valores acercándose a los valores basales de los grupos controles. Por otro lado y como era de esperar, gentamicina disminuyó el aclaramiento de creatinina de manera significativa en comparación con los controles, y la coadministración de cilastatina fue capaz de restaurar parcialmente los valores.

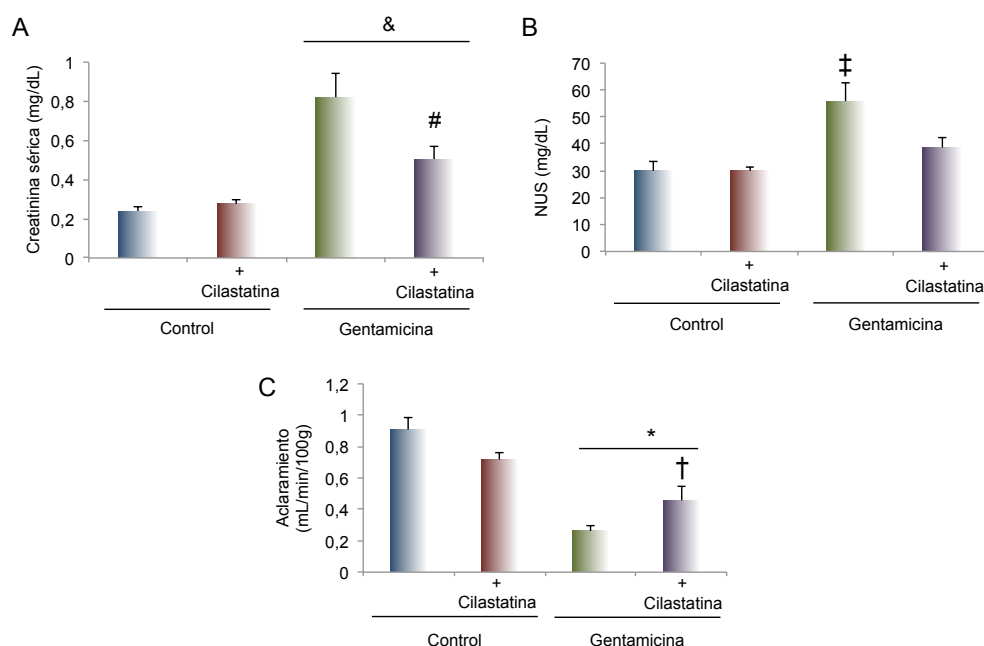


FIGURA 23. Efecto de cilastatina sobre la creatinina (A), nitrógeno ureico en sangre (NUS) (B) y aclaramiento de creatinina en suero (C). Los animales del grupo gentamicina vieron aumentados los niveles de creatinina sérica y NUS y disminuidos los de aclaramiento de creatinina, todos ellos de manera significativa con respecto a los grupos controles. El tratamiento con cilastatina recuperó totalmente los valores de NUS y parcialmente los de creatinina y aclaramiento, acercándolos a los valores control. Los datos se expresan como la media \pm EEM de $n=6-8$ animales por grupo. & $p \leq 0.01$ vs control y control + cilastatina, † $p \leq 0.05$ vs gentamicina, # $p \leq 0.01$ vs gentamicina, ‡ $p \leq 0.02$ vs resto de grupos, * $p \leq 0.05$ vs control y control + cilastatina.

La Tabla 10 muestra, además, el resto de valores de los distintos parámetros bioquímicos analizados en sangre.

| PARÁMETROS SÉRICOS | CONTROL | CONTROL + CILASTATINA | GENTAMICINA | GENTAMICINA + CILASTATINA |
|---------------------|--------------|-----------------------|---------------|---------------------------|
| Glucosa (mg/dL) | 232 ± 4 | 230 ± 8 | 193 ± 9 * | 211 ± 6 |
| Ácido Úrico (mg/dL) | 1.22 ± 0.26 | 1.15 ± 0.09 | 1.6 ± 0.15 | 1.51 ± 0.17 |
| Urea (mg/dL) | 30.0 ± 3.5 | 30.0 ± 1.3 | 55.8 ± 7.1 † | 38.7 ± 3.6 |
| Albúmina (g/dL) | 3.70 ± 0.05 | 3.87 ± 0.09 | 3.62 ± 0.15 | 3.74 ± 0.12 |
| Colesterol (mg/dL) | 46.0 ± 3.0 | 50.0 ± 2.0 | 61.1 ± 2.3 ‡ | 55.4 ± 3.3 |
| Sodio (mmol/L) | 139.6 ± 1.7 | 142.8 ± 0.7 | 133.1 ± 4.4 | 138.0 ± 2.1 |
| Potasio (mmol/L) | 4.48 ± 0.16 | 4.50 ± 0.12 | 4.26 ± 0.15 | 4.54 ± 0.23 |
| Cloruro (mmol/L) | 103.8 ± 8.4 | 106.5 ± 0.9 | 98.6 ± 2.7 * | 100.7 ± 2.3 |
| Calcio (mg/dL) | 10.02 ± 8.38 | 9.97 ± 0.11 | 9.68 ± 0.34 | 9.80 ± 0.25 |
| Fosfato (mg/dL) | 7.32 ± 0.25 | 6.90 ± 0.20 | 4.97 ± 0.22 ψ | 5.71 ± 0.25 ψ # |

TABLA 10. Parámetros bioquímicos en suero. Los datos se expresan como la media ± EEM de n=6-8 animales por grupo. *p ≤ 0.05 vs control y control + cilastatina, †p ≤ 0.05 vs resto de grupos, ‡p ≤ 0.05 vs control, ψp ≤ 0.005 vs control y control + cilastatina, #p ≤ 0.01 vs gentamicina.

1.2.2.- Parámetros bioquímicos en orina

El último día del estudio, los animales fueron introducidos durante 24h en jaulas metabólicas a fin de obtener su orina para llevar a cabo el estudio de los parámetros bioquímicos. En la Figura 24 se muestra el volumen urinario y la proteinuria. Puede observarse como la proteinuria (Figura 24A) es significativamente más elevada en los animales tratados con gentamicina, reduciéndose hasta valores normales en aquellos animales a los que conjuntamente se les suministró gentamicina y cilastatina. La Figura 24B muestra como el volumen de orina, tanto en animales pertenecientes al grupo gentamicina como los animales del grupo gentamicina y cilastatina, aumentó significativamente con respecto a los animales sanos pero sin encontrar diferencias entre ellos.

Resultados – Modelo *in vivo*

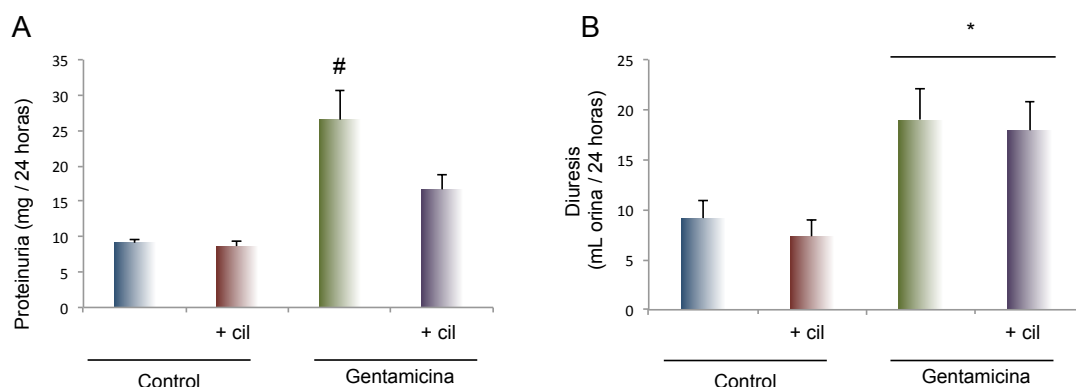


FIGURA 24. Efecto de cilastatina sobre la proteinuria y el volumen de orina. Los animales del grupo gentamicina vieron aumentados los niveles de proteinuria (A) de manera significativa con respecto a los grupos control. Aquellos que fueron tratados con gentamicina y cilastatina recuperaron valores similares a los de los controles. El volumen de orina (B) de los animales del grupo gentamicina aumentó con respecto a los controles y cilastatina no fue capaz de recuperar los niveles iniciales. Los datos se expresan como la media \pm EEM de $n=6-8$ animales por grupo. # $p \leq 0.01$ vs resto de grupos, * $p \leq 0.05$ vs grupo control y control + cilastatina. Cil: cilastatina.

Además se analizaron otra serie de parámetros bioquímicos en orina para analizar el efecto de gentamicina y cilastatina como se muestra en la Tabla 11. Como se puede observar, los animales del grupo tratado con gentamicina presentan orinas más diluidas, reduciendo significativamente las concentraciones de los electrolitos. Cilastatina no consiguió recuperar los niveles basales presentes en los controles en la mayoría de los casos.

| PARÁMETROS EN ORINA | CONTROL | CONTROL + CILASTATINA | GENTAMICINA | GENTAMICINA + CILASTATINA |
|---------------------|------------------|-----------------------|--------------------|---------------------------|
| Sodio | 192.0 \pm 13.3 | 162.8 \pm 20.9 | 92.0 \pm 11.0 # | 135.7 \pm 20.2 † |
| Potasio | 164.1 \pm 14.1 | 139.3 \pm 9.0 | 95.7 \pm 8.2 # | 103.5 \pm 10.2 # |
| Cloruro | 278.6 \pm 21.0 | 244.2 \pm 33.1 | 167.1 \pm 18.0 ‡ | 178.5 \pm 20.5 ‡ |
| Ácido úrico | 29.4 \pm 2.8 | 24.2 \pm 2.7 | 10.1 \pm 2.0 & | 11.3 \pm 2.3 & |
| Creatinina | 123.0 \pm 8.9 | 100.6 \pm 15.0 | 49.0 \pm 5.5& | 57.0 \pm 8.4& |
| Urea | 7014 \pm 780 | 6432 \pm 1452 | 1989 \pm 174‡ | 3237 \pm 532‡ |
| NUS | 3268 \pm 363 | 2997 \pm 677 | 1007 \pm 108‡ | 1509 \pm 248‡ |

TABLA 11. Parámetros bioquímicos en orina. Los datos se expresan como la media \pm EEM de $n=6-8$ animales por grupo. # $p \leq 0.05$ vs control y control + cilastatina, † $p \leq 0.05$ vs control y gentamicina, ‡ $p \leq 0.01$ vs control y control + cilastatina, & $p \leq 0.005$ vs control y control + cilastatina.

1.2.3.- Parámetros bioquímicos estimados de la función renal

Tras la obtención de los parámetros bioquímicos en suero y orina, se determinaron otros parámetros de la función renal, mediante las ecuaciones ya descritas en el apartado de *Materiales y Métodos* (Tabla 12). Los resultados mostraron que los animales tratados con gentamicina aumentaron los valores de aclaramiento de agua libre (ClH₂Oe) y excreción fraccional de sodio (EFNa⁺) significativamente con respecto a los controles, mientras que los niveles de TFG disminuyeron. Cilastatina recuperó totalmente los valores de los grupos controles en el caso de ClH₂Oe y parcialmente en el caso de EFNa⁺ y TFG.

| PARÁMETRO | CONTROL | CONTROL + CILASTATINA | GENTAMICINA | GENTAMICINA + CILASTATINA |
|---|---------------|-----------------------|----------------|---------------------------|
| Cl-Cl (mEq/L) | 20.59 ± 2.18 | 17.76 ± 2.43 | 25.54 ± 2.49 & | 27.69 ± 2.23 & |
| Carga Urinaria (mEq/L) | 40.67 ± 21.84 | 39.72 ± 12.00 | 42.31 ± 5.45 | 42.16 ± 12.18 |
| ClH ₂ Oe (mL H ₂ O/día) | -11.29 ± 1.20 | -8.19 ± 0.84 | -4.01 ± 2.91 † | -8.19 ± 2.21 |
| EFH ₂ O (%) | 0.24 ± 0.06 | 0.28 ± 0.04 | 3.27 ± 0.51 ‡ | 1.02 ± 0.22 |
| EF Na ⁺ (%) | 0.27 ± 0.02 | 0.27 ± 0.03 | 1.22 ± 0.17 ¥ | 0.77 ± 0.10 ¥# |
| TFG (mL/min/100g) | 0.85 ± 0.05 | 0.72 ± 0.05 | 0.29 ± 0.05 * | 0.52 ± 0.11 *# |

TABLA 12. Parámetros estimados de función renal. Los datos se expresan como la media ± EEM de n=6-8 animales por grupo. &p ≤ 0.05 control + cilastatina, †p ≤ 0.05 vs control, ‡p ≤ 0.001 vs resto de grupos, ¥p ≤ 0.01 vs control y control + cilastatina. *p ≤ 0.05 vs control y control + cilastatina, #p ≤ 0.01 vs gentamicina. CLH₂O: aclaramiento de agua libre; EFH₂O: excreción fraccional de agua; EFNa⁺: excreción fraccional de Na⁺; TFG: tasa de filtración glomerular.

1.2.4.- Cilastatina reduce la expresión de KIM-1

KIM-1 (*Kidney Injury Molecule 1*) es una proteína transmembrana de tipo 1 cuya expresión aumenta en los túbulos proximales cuando existe cualquier tipo de daño renal, siendo por lo tanto utilizado como biomarcador en las células tubulares al producirse FRA. Se estudió la síntesis de KIM-1 mediante inmunolocalizaciones en secciones de tejido renal. En la Figura 25 se observa como en los animales tratados con gentamicina (Figura 25C) hubo una expresión masiva de KIM-1 en correlación al daño

producido en estos animales. Cilastatina, sin embargo, redujo completamente la concentración de esta proteína expresada en el tejido renal (Figura 25D).

Además se determinó la síntesis de la proteína mediante western blot viéndose un claro aumento en animales tratados con gentamicina mientras que los animales tratados con gentamicina y cilastatina mostraron una expresión casi ausente y similar a los controles (Figuras 25F y G).

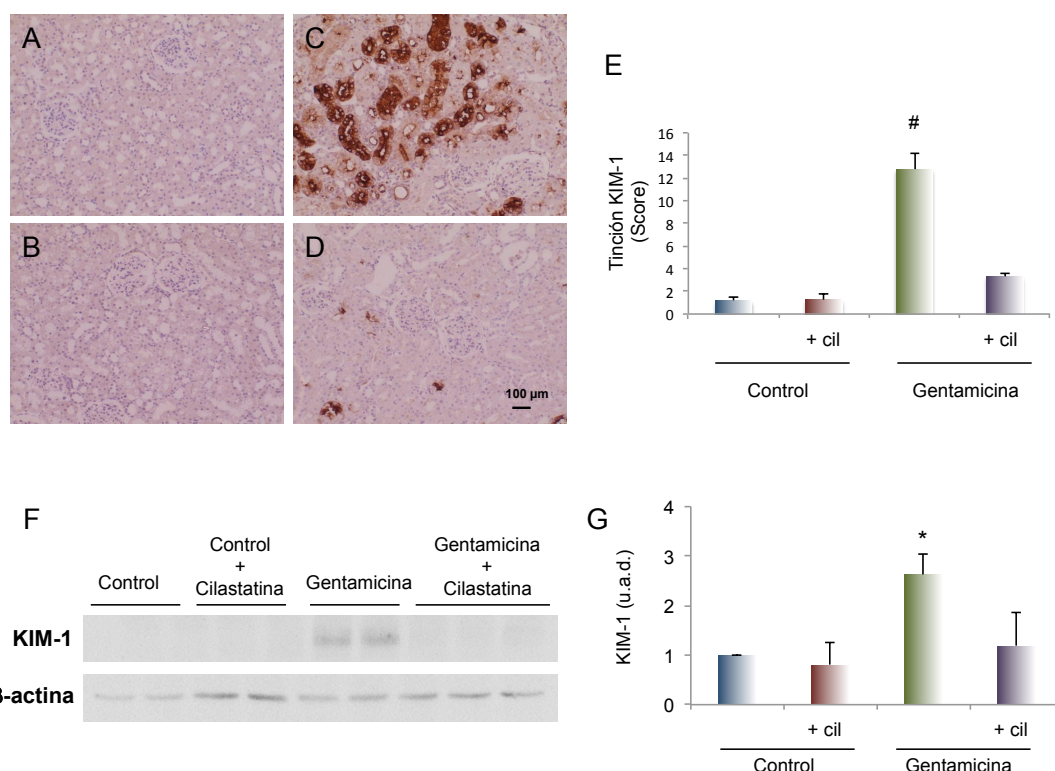


FIGURA 25. Efecto de gentamicina y cilastatina sobre la síntesis de KIM-1 en tejido renal. (A-D) Imágenes representativas de inmunolocalizaciones de KIM-1 en secciones de corteza renal. Las imágenes corresponden a grupo control (A), control + cilastatina (B), gentamicina (C) y gentamicina + cilastatina (D). Estimación semicuantitativa o "score" de la tinción de KIM-1 (E). Western blot de KIM-1 y β-actina (control de carga) (F) y cuantificación del densitometrado del western blot realizado y corregido con su control de carga (G). Se aprecia un aumento en la síntesis de esta proteína en animales tratados con gentamicina. Los animales del grupo gentamicina + cilastatina experimentaron un descenso elevado en la presencia de KIM-1 hasta alcanzar valores basales mientras que los controles quedan ausentes de la presencia de esta proteína. Magnificación de las inmunolocalizaciones 10X. Los resultados se expresan como la media ± EEM de n=6-8 animales por grupo. #p ≤ 0.005 vs resto de grupos, *p ≤ 0.05 vs resto de grupos. Cil: cilastatina, u.a.d.: unidades arbitrarias de densitometrado.

Con el fin de comprobar si cilastatina era capaz también de producir cambios a nivel transcripcional, se estudió mediante PCR la expresión génica a tiempo real de KIM-1 (Figura 26). El tratamiento con gentamicina aumento muy significativamente los

valores de expresión con respecto a los controles. Sin embargo, cilastatina no ejerció ningún efecto en la expresión del gen, manteniéndose su expresión en valores semejantes a los del grupo gentamicina.

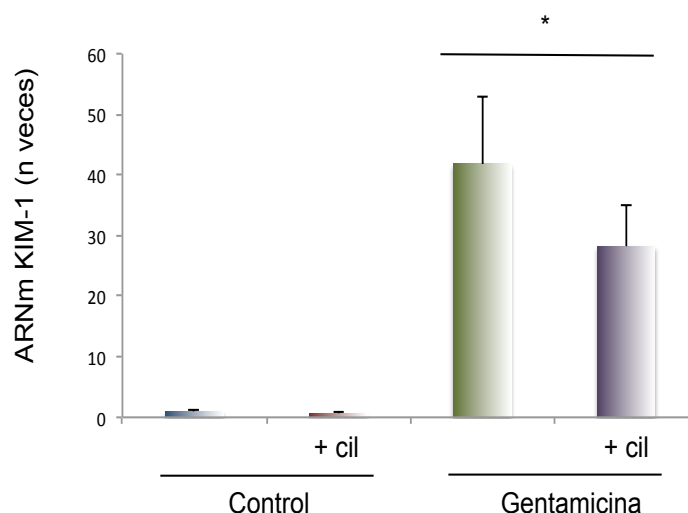


FIGURA 26. Efecto de gentamicina y cilastatina sobre la regulación transcripcional del gen de KIM-1 en corteza renal. La expresión de KIM-1 fue analizada por RT-PCR cuantitativa. Gentamicina aumentó los niveles de expresión del gen respecto a los niveles basales de manera significativa pero su coadministración con cilastatina no promovió cambios. Los resultados se expresan como la media \pm EEM de $n=6-8$ animales por grupo. * $p \leq 0.01$ vs control y control + cilastatina. Cil: cilastatina.

1.2.5.- Estudio de la morfología renal

1.2.5.1- Morfología cortical

El modelo establecido de inducción de FRA por gentamicina, afecta principalmente a las células del túbulo proximal localizadas en la zona cortical del riñón. A fin de poder analizar el grado y tipo de lesión generados por el antibiótico, así como su protección por acción de cilastatina, se estudió la morfología en secciones renales incluidas en parafina y teñidas con hematoxilina/eosina, observando un claro daño en el grupo de animales tratados con gentamicina debido a la presencia de acúmulos proteicos en el interior de la luz tubular, vacuolización, necrosis tubular, etc (Figura 27C). En el caso de los grupos controles y el grupo gentamicina + cilastatina no se evidenció daño a nivel histológico (Figuras 27A, B y D).

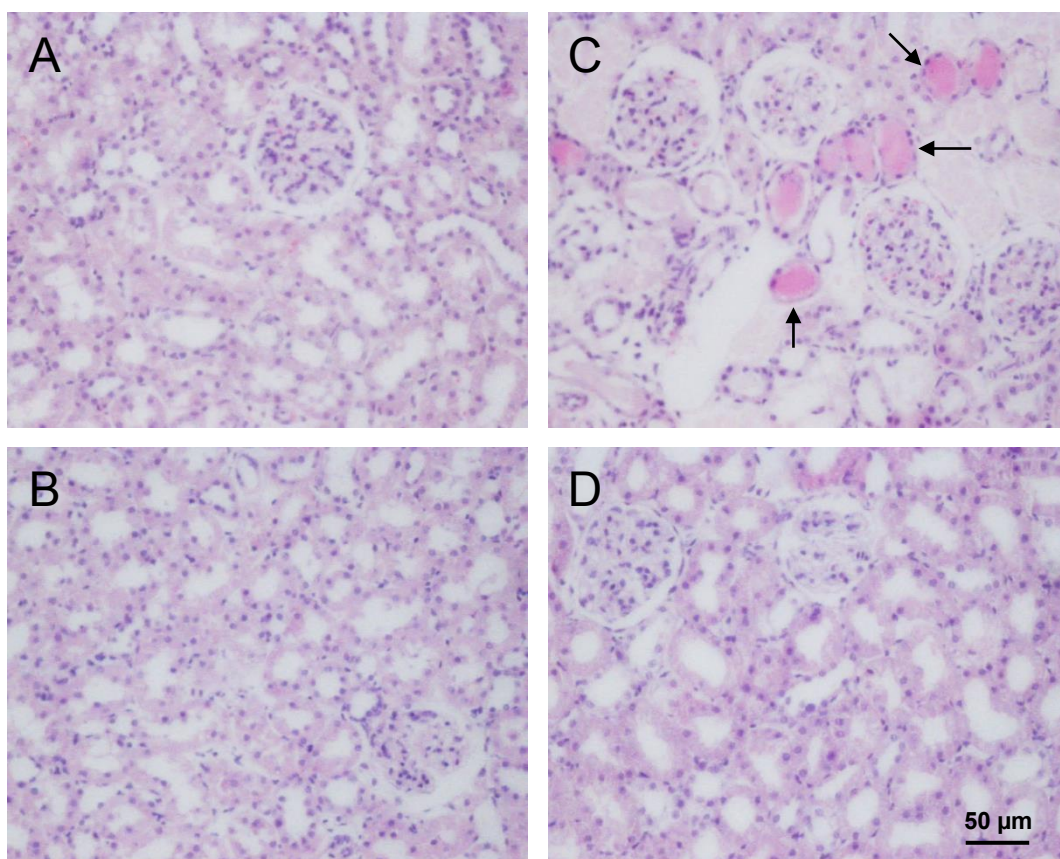


FIGURA 27. Efecto de gentamicina y cilastatina en la morfología. Detalles de la histología renal cortical. Las imágenes corresponden a grupo control (A), control + cilastatina (B), gentamicina (C) y gentamicina + cilastatina (D). Tinciones hematoxilina/eosina, magnificación 10X. Las flechas marcan la presencia de depósitos proteicos bloqueando la luz del túbulo proximal.

1.2.5.2- Morfología medular

Tras observar cambios a nivel cortical en los túbulos proximales, se observaron los cambios en la zona medular. De la misma manera que en la corteza, se observan depósitos proteicos que taponan la luz de los túbulos en las médulas de los animales tratados con gentamicina que no aparecen en el resto de los grupos (Figura 28).

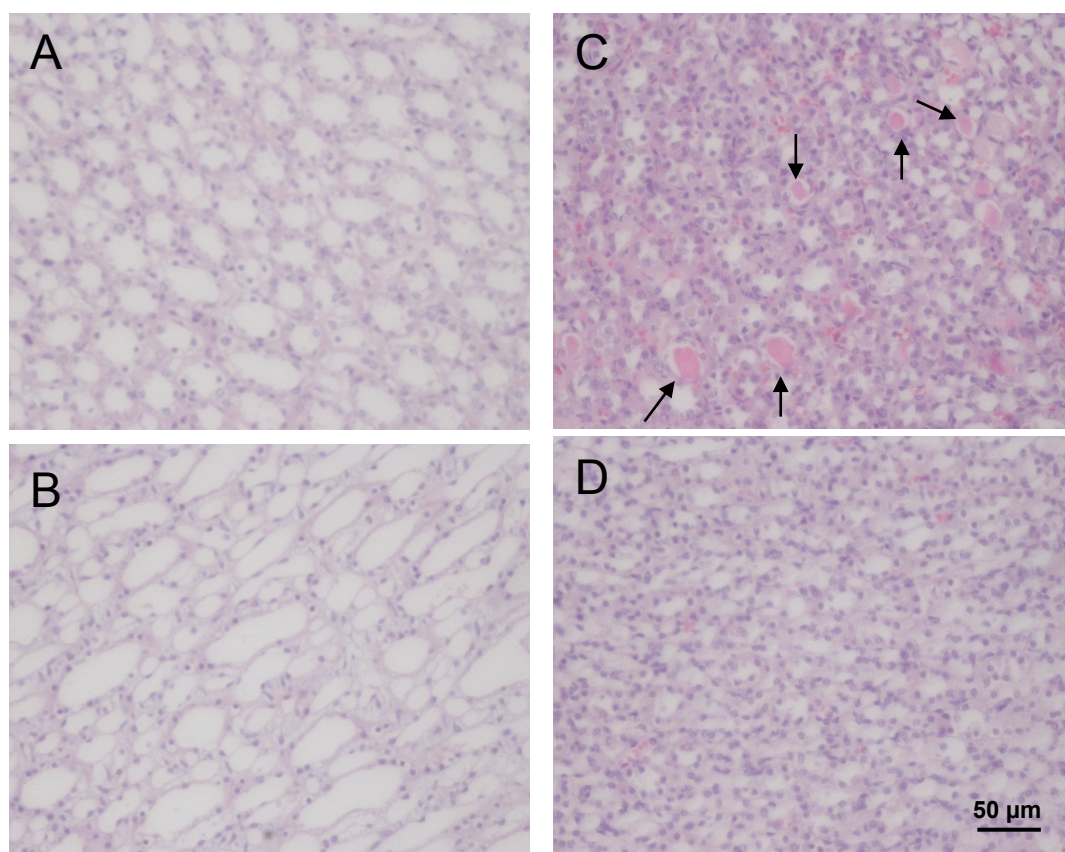


FIGURA 28. Efecto de gentamicina y cilastatina en la morfología. Detalles de la histología renal medular. Las imágenes corresponden a grupo control (A), control + cilastatina (B), gentamicina (C) y gentamicina + cilastatina (D). Tinciones de hematoxilina/eosina, magnificación 10X. Las flechas marcan la presencia de depósitos proteicos bloqueando la luz de los túbulos.

1.2.5.3- Puntuación o “score” de daño renal

Este análisis llevó a la conclusión de que existía un daño renal significativamente más elevado en los animales del grupo gentamicina en comparación con los controles, mientras que los animales que además recibieron cilastatina mostraron un índice de daño significativamente menor y prácticamente igual a los controles (Figura 29).

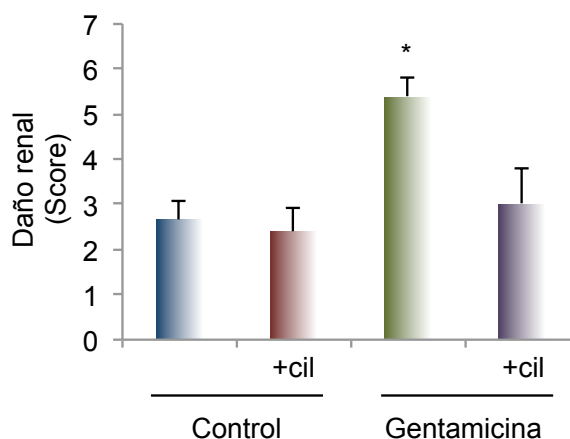


FIGURA 29. Score de daño renal. Se cuantificó el daño renal de manera semicuantitativa en las tinciones con hematoxilina/eosina. Los animales tratados exclusivamente con gentamicina muestran el doble de daño con respecto a los controles. Cilastatina disminuyó significativamente todas las alteraciones renales. Los resultados se expresan como la media \pm EEM de $n=6-8$ animales por grupo. * $p \leq 0.005$ vs resto de los grupos. Cil: cilastatina.

1.3.- Efecto de cilastatina sobre la apoptosis

Como a nivel *in vitro* habíamos observado protección con cilastatina frente a la apoptosis, decidimos probar a nivel *in vivo* si cilastatina también conseguía proteger de la misma. Para ello medimos los niveles de diferentes moléculas pro-apoptóticas y anti-apoptóticas.

1.3.1.- Cilastatina impide la aparición de caspasa-9

Las caspasas son un grupo de proteínas esenciales en los procesos de apoptosis, por lo que el estudio de su síntesis resulta esencial para conocer el nivel de protección de cilastatina en un modelo animal de nefrotoxicidad generado por gentamicina. Inicialmente se analizó mediante western blot, la síntesis de la caspasa-9 activa en corteza renal, proteasa iniciadora de la ruta intrínseca de la apoptosis mediada en la mitocondria. Los resultados obtenidos mostraron un aumento elevado y significativo de la expresión de caspasa-9 activa en los animales tratados con gentamicina en comparación con los grupos control. La coadministración con cilastatina impidió la activación de la caspasa, reduciendo sus niveles hasta valores similares a los encontrados en los grupos controles (Figura 30).

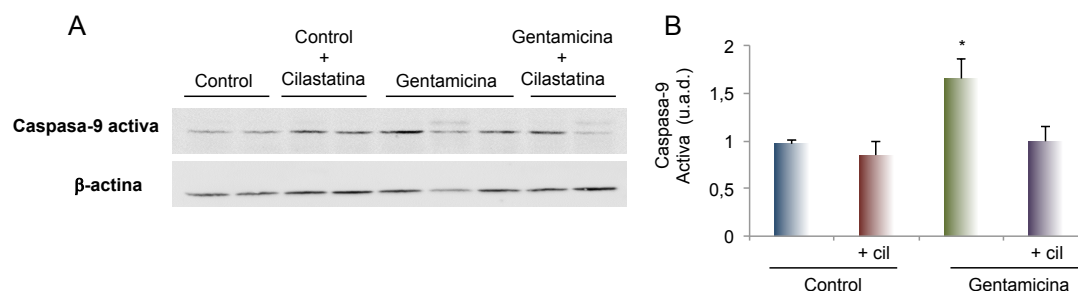


FIGURA 30. Efecto de gentamicina y cilastatina sobre la síntesis de caspasa-9 activa en tejido renal. A) Imágenes representativas de western blot de caspasa-9 activa y β -actina (control de carga) en muestras de corteza renal. B) Cuantificación del densitometrado del western blot realizado y corregido por el control de carga. Los animales del grupo gentamicina aumentaron significativamente los niveles de expresión de caspasa-9 activa. El tratamiento con cilastatina, recuperó los valores con respecto a los grupos controles. Los resultados se expresan como la media \pm EEM de n=6-8 animales por grupo. * $p \leq 0.05$ vs resto de grupos. Cil: cilastatina, u.a.d.: unidades arbitrarias de densitometrado.

1.3.2.- Cilastatina impide la aparición de caspasa-3

Continuando con el estudio de los mecanismos implicados en la muerte por gentamicina, se analizó la expresión de caspasa-3; caspasa central ejecutora en la vía final común a las principales rutas conocidas de muerte celular programada, activada por proteólisis de otras caspasas como por ejemplo la caspasa-9¹¹⁶. Por tanto se realizó el estudio de su precursor, procaspasa-3 y de su forma activada en corteza renal por western blot, viéndose un claro aumento de la síntesis de caspasa-3 activa en animales tratados con gentamicina (Figuras 31A y C) así como un descenso notorio en la expresión de procaspasa-3 (Figuras 31A y B). En el caso de caspasa-3 activa, cilastatina consiguió impedir su activación presentando niveles similares a los alcanzados en los grupos controles.

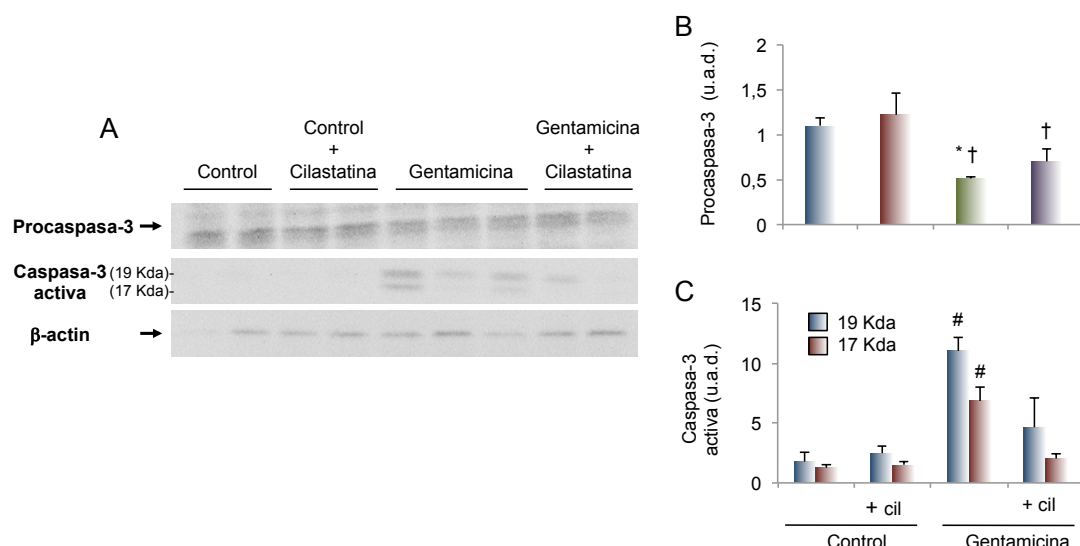


FIGURA 31. Efecto de gentamicina y cilastatina sobre la síntesis de caspasa-3 en tejido renal. A) Imágenes representativas de western blot de procaspasa y caspasa-3 activa y β-actina (control de carga) en muestras de corteza renal. B) y C) Cuantificación de los densitometrados de los western blot realizados y corregidos por el control de carga. Los animales del grupo gentamicina vieron disminuidos significativamente los niveles de expresión de procaspasa-3 y aumentados los de caspasa-3 activa. El tratamiento con cilastatina, recuperó parcial y significativamente la expresión de procaspasa-3 y totalmente la expresión de caspasa-3 activa con respecto a los grupos controles. Los resultados se expresan como la media ± EEM de n=6-8 animales por grupo. *p ≤ 0.05 vs control, †p ≤ 0.05 vs control + cilastatina, #p ≤ 0.05 vs resto de grupos. Cil: cilastatina, u.a.d.: unidades arbitrarias de densitometrado.

Además de los resultados obtenidos por western blot, se llevaron a cabo inmunolocalizaciones de caspasa-3 activa en secciones de tejido renal para ver en qué zona concreta del riñón se expresaba. La Figura 32 muestra caspasa-3 activa en los núcleos de las PTEC en animales tratados con gentamicina (Figuras 32B y C). La presencia de cilastatina en coadministración con gentamicina (Figura 32E) reduce considerablemente la presencia de esta proteína en las células coincidiendo plenamente con los resultados obtenidos en el western. No se observa tinción glomerular en ninguno de los casos.

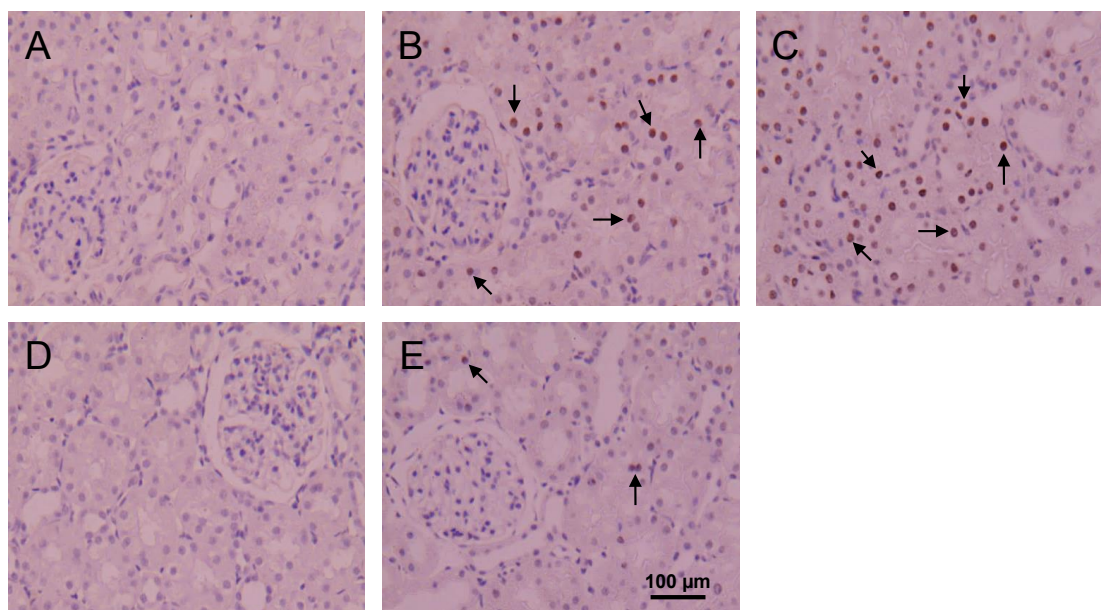


FIGURA 32. Efecto de gentamicina y cilastatina sobre la síntesis de caspasa-3 activa en tejido renal. Imágenes representativas de inmunolocalizaciones de caspasa-3 activa en secciones de corteza renal en parafina. Las imágenes corresponden a grupo control (A), gentamicina (B y C), control + cilastatina (D) y gentamicina + cilastatina (E). Se aprecia un aumento en la síntesis de esta proteína en animales tratados con gentamicina. Los animales del grupo gentamicina + cilastatina experimentaron un descenso notorio de la activación de caspasa-3 mientras que los controles quedaban ausentes de la presencia de caspasa-3 activa. La proteína se localiza a nivel nuclear. Magnificación de las inmunolocalizaciones 20X. Las flechas marcan la presencia de caspasa-3 activa en los núcleos de las células tubulares proximales.

1.3.3.- Cilastatina reduce la aparición de Bax pero no de Bcl-2

Las proteínas de la familia Bcl-2 regulan los procesos de permeabilización mitocondrial. Dentro de esta familia de proteínas se encuentran proteínas anti-apoptóticas como Bcl-2 y pro-apoptóticas como Bax. Se realizó el estudio de la síntesis de estas proteínas en corteza renal mediante western blot observando un aumento significativo de la producción de Bax en animales tratados con gentamicina. Este aumento quedó bloqueado con el tratamiento de gentamicina más cilastatina manteniéndose en niveles similares a los de los controles (Figura 33). En el caso de la proteína Bcl-2, no se produjeron cambios en la síntesis en los diferentes grupos analizados, presentando valores muy parejos entre ellos.

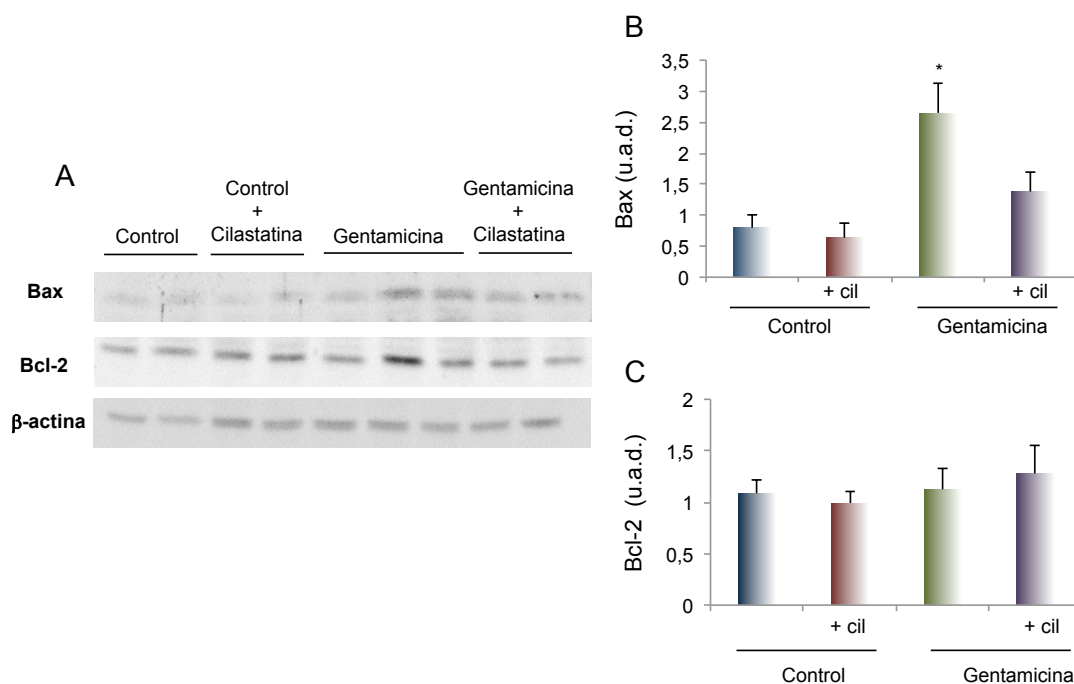


FIGURA 33. Efecto de gentamicina y cilastatina sobre la síntesis de Bax y Bcl-2 en tejido renal. A) Imágenes representativas de western blot de Bax y Bcl-2 usando β -actina como control de carga en muestras de corteza renal. B) y C) Cuantificación de los densitometrados de los western blot realizados y corregidos por el control de carga. Se observa un aumento significativo de Bax en las muestras del grupo gentamicina con respecto al resto de los grupos. El tratamiento con cilastatina, redujo la síntesis de Bax hasta niveles similares alcanzados en los grupos control. No existen diferencias significativas entre grupos en la síntesis de Bcl-2. Los resultados se expresan como la media \pm EEM de $n=6-8$ animales por grupo. * $p \leq 0.02$ vs resto de los grupos. Cil: cilastatina, u.a.d.: unidades arbitrarias de densitometrado.

Normalmente en la medida de daño no solo suelen darse los valores de síntesis de estas dos proteínas por separado sino que además suele establecerse el ratio Bax/Bcl-2 que da una idea del estado de susceptibilidad hacia la apoptosis de una célula o tejido. De esta manera, un ratio Bax/Bcl-2 alto indica una baja resistencia celular a estímulos apoptóticos. La Figura 34 representa ese ratio Bax/Bcl-2 en las muestras de corteza renal observándose un aumento significativo en los animales tratados con gentamicina con respecto a los grupos controles. Cilastatina redujo significativamente la relación establecida entre Bax/Bcl-2 hasta alcanzar valores cercanos a los basales de los grupos control.

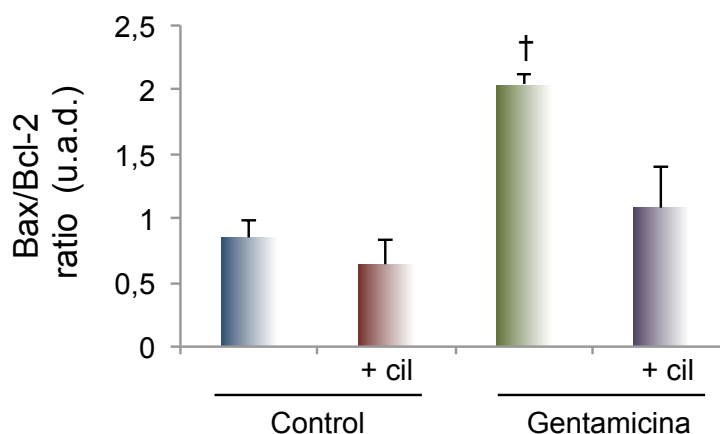


FIGURA 34. Efecto de gentamicina y cilastatina sobre el ratio Bax/Bcl-2 en tejido renal. Se observa un aumento significativo del ratio Bax/Bcl-2 en las muestras del grupo gentamicina con respecto a los controles. El tratamiento con cilastatina, redujo la relación establecida Bax/Bcl-2. Los resultados se expresan como la media \pm EEM de n=6-8 animales por grupo. [†]p \leq 0.02 vs resto de grupos. Cil: cilastatina, u.a.d.: unidades arbitrarias de densitometrado.

1.3.4.- Cilastatina impide la activación de la ruta Fas/Fas-L

Una vez vista la importancia de la vía intrínseca de la apoptosis, decidimos conocer si la vía extrínseca también estaba implicada en la muerte celular inducida por gentamicina y el correspondiente efecto con cilastatina. Para ello, se estudiaron los niveles de expresión de Fas, receptor de muerte celular, y de su ligando Fas-L en extractos de corteza renal (Figura 35). El estudio por western blot mostró que gentamicina aumentaba los niveles de expresión de la forma glicosidada y nativa de Fas sin producirse cambios significativos en el fragmento activo. Para el caso de Fas-L, gentamicina incrementaba su expresión de manera significativa. El cotratamiento con cilastatina permitió la recuperación total de las formas de Fas modificadas por gentamicina así como de Fas-L en comparación con los niveles de expresión alcanzados en los controles.

Además se quiso comprobar si cilastatina ejercía algún efecto a nivel transcripcional sobre la expresión del receptor de muerte Fas y su ligando. En la Figura 35A puede observarse como gentamicina aumenta los niveles de expresión génica de Fas de manera muy significativa con respecto a los grupos control. Por otro lado, en el caso de Fas-L (Figura 36B), si bien los animales tratados con gentamicina muestran un aumento significativo en relación únicamente al grupo control + cilastatina, sí que existe una tendencia que permite llegar a la misma conclusión que para el caso de su receptor Fas. Tanto para Fas como para Fas-L, cilastatina no fue capaz de disminuir los valores de ARNm con respecto a los animales tratados con gentamicina.

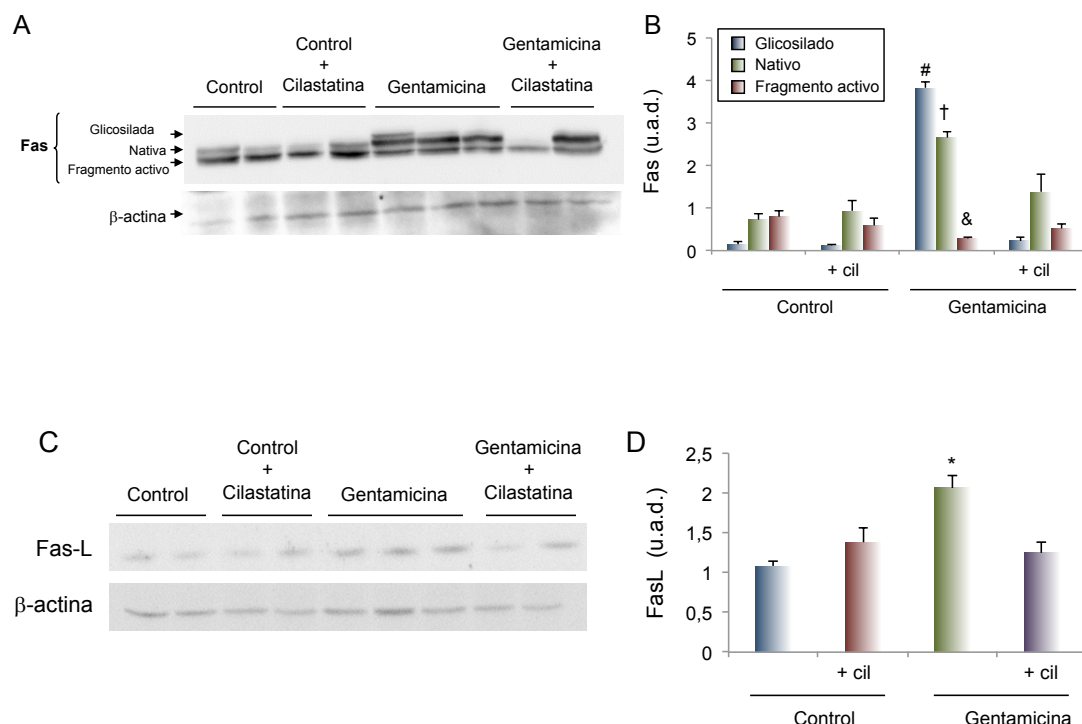


FIGURA 35. Efecto de gentamicina y cilastatina sobre la síntesis de Fas y Fas-L en tejido renal. A y C) Imágenes representativas de western blot de Fas y Fas-L y sus controles de carga β-actina en muestras de corteza renal. B y D) Cuantificación de los densitometrados de los western blot realizados y corregidos con sus controles de carga. Se observa un aumento en la síntesis de las formas glicosilada y nativa de la proteína Fas en los animales tratados con gentamicina. Ningún tratamiento provocó alteraciones del fragmento activo de Fas. La administración de gentamicina también provocó un aumento significativo en la síntesis de Fas-L. La administración con cilastatina al tratamiento con gentamicina restauró los niveles de ambas moléculas hasta niveles similares a los encontrados en los controles. Los resultados se expresan como la media ± EEM de n=6-8 animales por grupo. [#]p ≤ 0.0001 vs resto de grupos, [†]p ≤ 0.02 vs resto de grupos, [&]p ≤ 0.01 vs control, ^{*}p ≤ 0.05 vs resto de grupos. Cil: cilastatina, u.a.d.: unidades arbitrarias de densitometrado.

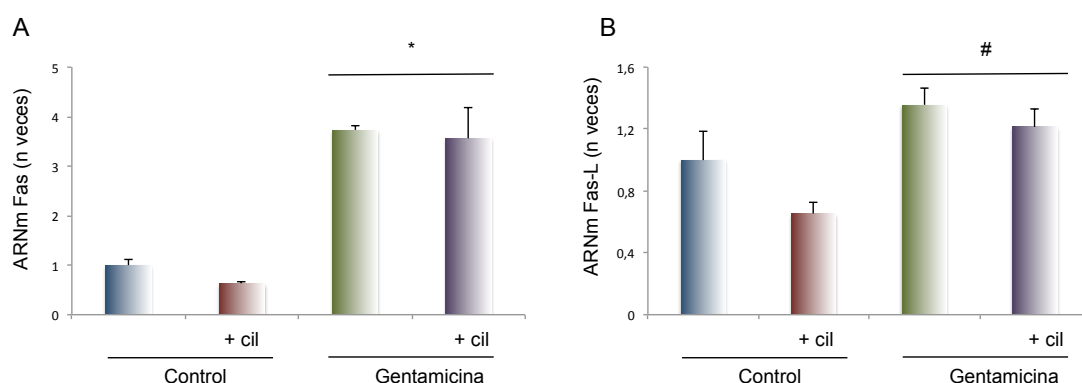


FIGURA 36. Efecto de gentamicina y cilastatina sobre la regulación transcripcional de los genes de Fas y Fas-L en corteza renal. La expresión de Fas y Fas-L fue analizada por RT-PCR cuantitativa. Gentamicina aumentó los niveles de expresión de ambos genes significativamente. Cilastatina no promovió cambios. Los resultados se expresan como la media ± EEM de n=6-8 animales por grupo. ^{*}p ≤ 0.05 vs control y control + cilastatina, [#]p ≤ 0.02 vs control + cilastatina. Cil: cilastatina.

1.3.5.- Cilastatina no modifica los niveles de caspasa-8 activa

Caspasa-8 es la caspasa iniciadora de la vía extrínseca de la apoptosis o de los receptores de muerte. Se analizaron mediante western blot los niveles de la proteína en la corteza renal de los animales. Los resultados (Figura 37) muestran que los animales de los distintos grupos presentan los mismos niveles de síntesis de caspasa-8 activa, no habiendo diferencias tras el tratamiento con gentamicina o cilastatina.

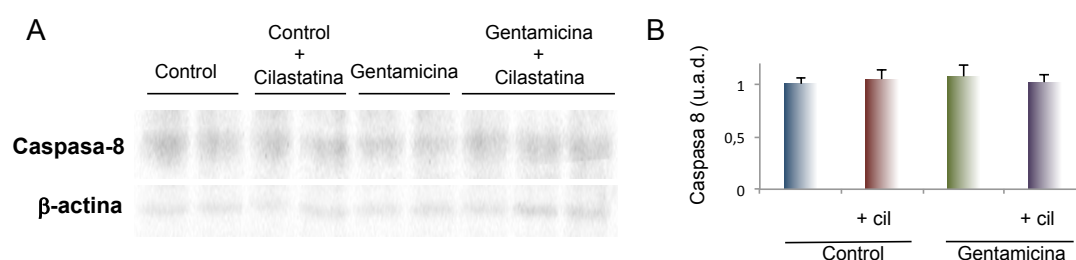


FIGURA 37. Efecto de gentamicina y cilastatina sobre la síntesis de caspasa-8 activa en tejido renal. A) Imágenes representativas de western blot de caspasa-8 activa y β-actina (control de carga) en muestras de corteza renal. B) Cuantificación del densitometrado del western blot realizado y corregido por el control de carga. Se observa como no se produjeron cambios en la síntesis de caspasa-8 entre los distintos grupos de animales analizados. Los resultados se expresan como la media ± EEM de n=6-8 animales por grupo. Cil: cilastatina, u.a.d.: unidades arbitrarias de densitometrado.

1.3.6.- Cilastatina impide la fragmentación del ADN

Durante el proceso de apoptosis, la caspasa-3 activa viaja al núcleo, donde activará nucleasas que fragmentan el ADN. Mediante la técnica de TUNEL se estudia el porcentaje de células que presentan ADN fragmentado en las muestras de tejido renal incluidas en parafina. Como se observa en la Figura 38, el tratamiento con gentamicina provoca una elevada fragmentación del ADN en las células renales. El tratamiento conjunto de gentamicina con cilastatina reduce esta fragmentación de manera significativa aunque sin llegar al nivel de los grupos control, donde prácticamente no hay ADN fragmentado.

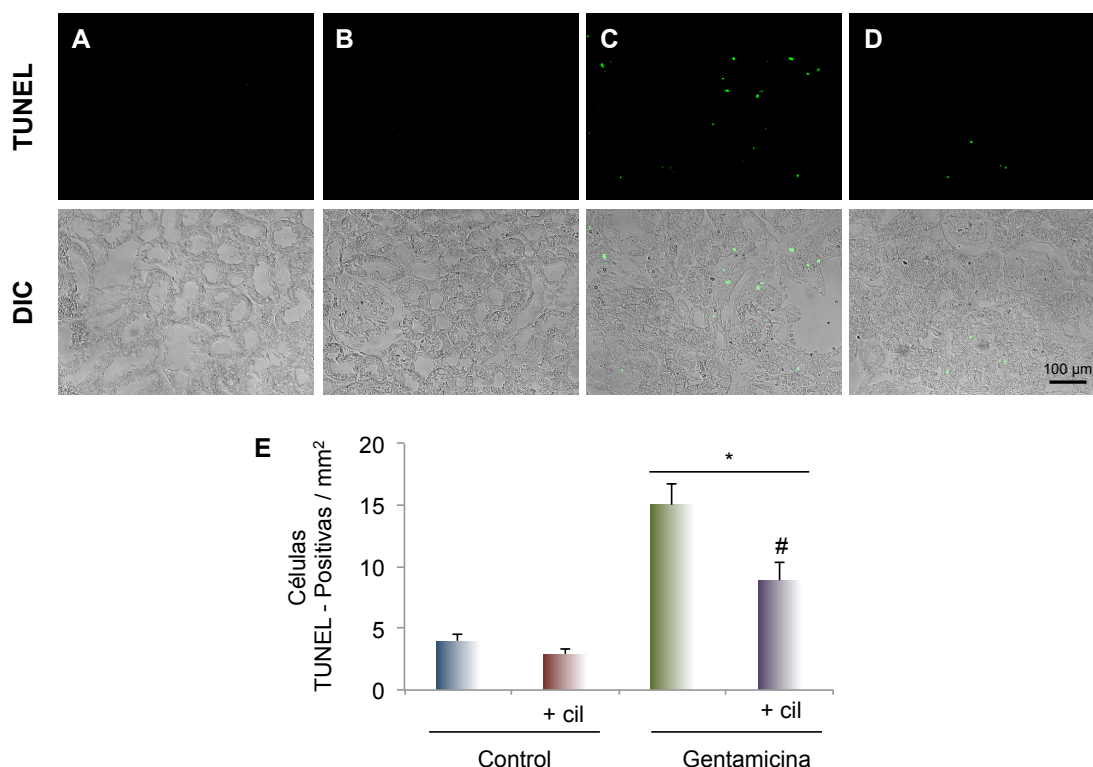


FIGURA 38. Efecto de gentamicina y cilastatina sobre la fragmentación de ADN inducida por gentamicina en tejido renal. (A-D) Imágenes representativas de la tinción de TUNEL en secciones de tejido renal. Las imágenes corresponden a grupo control (A), control + cilastatina (B), gentamicina (C), gentamicina + cilastatina (D). La fluorescencia verde indica los núcleos TUNEL-positivos. Cuantificación de los núcleos TUNEL-positivos/mm² (E). El tratamiento con gentamicina aumenta la presencia de ADN fragmentado. Su coadministración con cilastatina reduce la fragmentación de manera significativa. Los resultados se expresan como la media \pm EEM de $n=6-8$ animales por grupo. * $p \leq 0.05$ vs grupos control y control + cilastatina, # $p \leq 0.05$ vs grupo gentamicina. Magnificación 20X. Cil: cilastatina, DIC: contraste diferencial interferencial.

1.4.- Efecto de cilastatina sobre el estrés oxidativo

1.4.1.- Cilastatina recupera la capacidad antioxidante

La presencia de ROS provoca un aumento de radicales libres, provocando en el organismo un descenso de la capacidad antioxidante⁷⁶. Para estudiar si esto es lo que estaba ocurriendo en los animales tratados con gentamicina y observar el posible efecto de cilastatina, analizamos el estado de los sistemas antioxidantes en la orina, mediante la realización de un ELISA de capacidad antioxidante total. Como puede observarse en la Figura 39, el tratamiento con gentamicina redujo los niveles de los sistemas antioxidantes de manera significativa, mientras que cilastatina fue capaz de restaurar totalmente los niveles hasta la capacidad habitual de los controles.

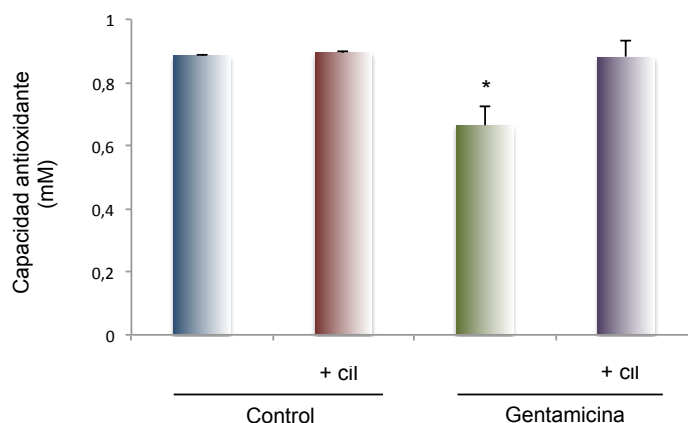


FIGURA 39. Efecto de gentamicina y cilastatina sobre la capacidad antioxidante renal. Los animales tratados con gentamicina redujeron su capacidad antioxidante. El tratamiento de gentamicina y cilastatina recuperó totalmente dicha capacidad. Los resultados se expresan como la media \pm EEM de \approx 6-8 animales por grupo. * $p \leq 0.005$ vs resto de los grupos. Cil: cilastatina.

Para estudiar de manera más específica alguno de estos sistemas antioxidantes, analizamos en mayor profundidad dos de ellos, la Cu/Zn SOD y la catalasa.

1.4.2.- Cilastatina impide la disminución de los niveles de Cu/Zn superóxido dismutasa

Diversos estudios han mostrado que cantidades insuficientes de la enzima Cu/Zn SOD dan lugar a la producción de ROS por lo que su actividad antioxidante resulta crucial en la protección celular frente al EO. Por lo tanto, debido a su importancia, se analizó mediante western blot su expresión en muestras de corteza renal de los animales. Los datos obtenidos y mostrados en la Figura 40F y G muestran un descenso de la producción de la enzima en los animales del grupo gentamicina mientras que cilastatina consiguió restablecer los niveles de expresión de la enzima. Estos datos se corroboraron mediante inmunolocalizaciones de Cu/Zn SOD de muestras parafinadas de corteza renal en las que se obtuvieron resultados similares (Figuras 40A-D).

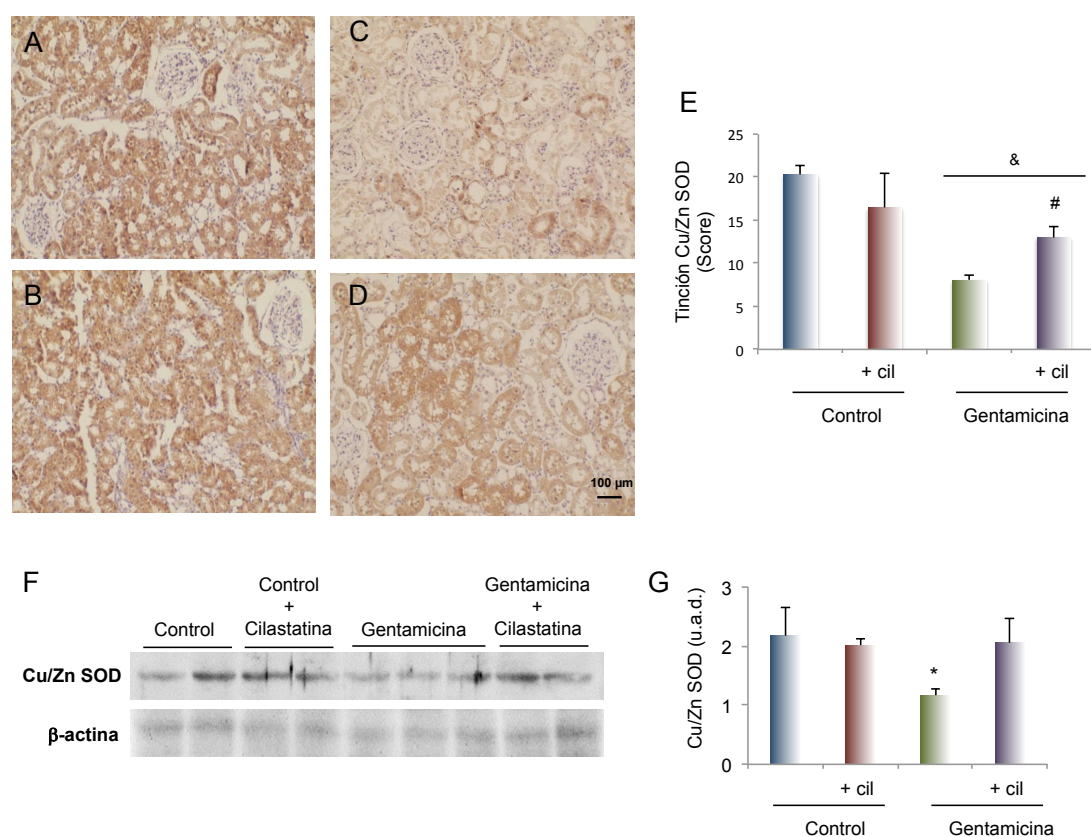


FIGURA 40. Efecto de gentamicina y cilastatina sobre la síntesis de Cu/Zn SOD en corteza renal. (A-D) Imágenes representativas de inmunolocalizaciones de Cu/Zn SOD en secciones de tejido renal. Las imágenes corresponden a grupo control (A), control + cilastatina (B), gentamicina (C), gentamicina + cilastatina (D). Estimación semicuantitativa o “score” de la tinción de Cu/Zn SOD (E). Western blot de Cu/Zn SOD y β -actina (control de carga) (F) y cuantificación del densitometrado del western blot realizado y corregido con su control de carga (G). Se aprecia una disminución de la expresión de esta proteína en animales tratados con gentamicina. Cilastatina recuperó significativamente los niveles de expresión de Cu/Zn SOD hasta valores similares a los de los controles. Magnificación de las inmunolocalizaciones 10X. Los resultados se expresan como la media \pm EEM de $n=6-8$ animales por grupo. * $p \leq 0.05$ vs resto de grupos, & $p \leq 0.01$ vs control, # $p \leq 0.02$ vs gentamicina. Cil: cilastatina, u.a.d.: unidades arbitrarias de densitometrado.

1.4.3.- Cilastatina impide la disminución de los niveles de catalasa

La catalasa es una proteína perteneciente a la categoría de las oxidoreductasas cuya función es la de convertir el H_2O_2 en agua y oxígeno. La Figura 41 muestra mediante western blot los niveles de expresión de la enzima en los distintos grupos analizados. Se observa una disminución significativa en los animales del grupo gentamicina como era de esperar tras los resultados obtenidos anteriormente y una recuperación total en los animales tratados conjuntamente con cilastatina.

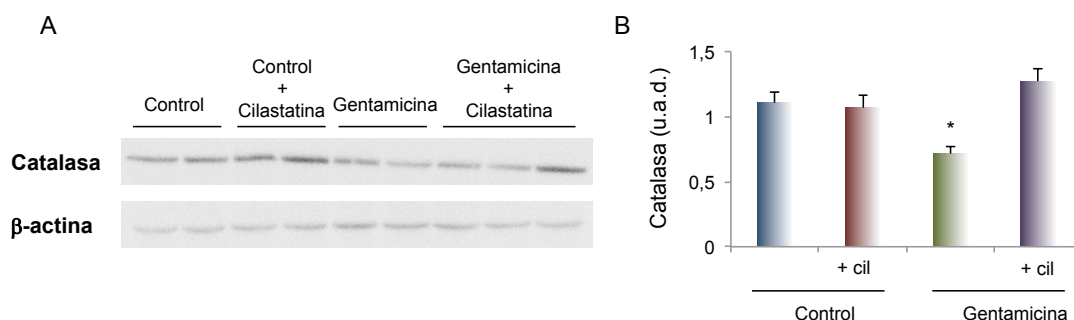


FIGURA 41. Efecto de gentamicina y cilastatina sobre la síntesis de catalasa en corteza renal. A) Imágenes representativas de western blot de catalasa y β -actina (control de carga) en muestras de corteza renal. B) Cuantificación del densitometrado del western blot realizado y corregido por el control de carga. Se observa una disminución significativa de catalasa en las muestras del grupo gentamicina. El tratamiento con cilastatina, recuperó los niveles basales de expresión de la enzima encontrados en los grupos control. Los resultados se expresan como la media \pm EEM de $n=6-8$ animales por grupo. * $p \leq 0.05$ vs resto de grupos. Cil: cilastatina, u.a.d.: unidades arbitrarias de densitometrado.

1.4.4.- Cilastatina impide el aumento de HSP-27

Las proteínas de shock térmico o HSPs están presentes en pequeñas cantidades en todas las células cuando éstas sufren algún tipo de estrés como consecuencia de cambios de temperatura, presencia de sustancias tóxicas, aumentos de presión, isquemias, etc. El aumento de la expresión de estas proteínas está directamente relacionado con la protección de la célula frente a EO o apoptosis^{91,92}. Se comprobó el efecto causado por gentamicina y/o cilastatina en la expresión de HSP-27 mediante western blot en muestras de corteza renal (Figura 42). Gentamicina aumentó considerablemente los niveles de expresión de HSP-27 mientras que en combinación con cilastatina se inhibió la síntesis de la proteína hasta niveles parecidos a los de los grupos control.

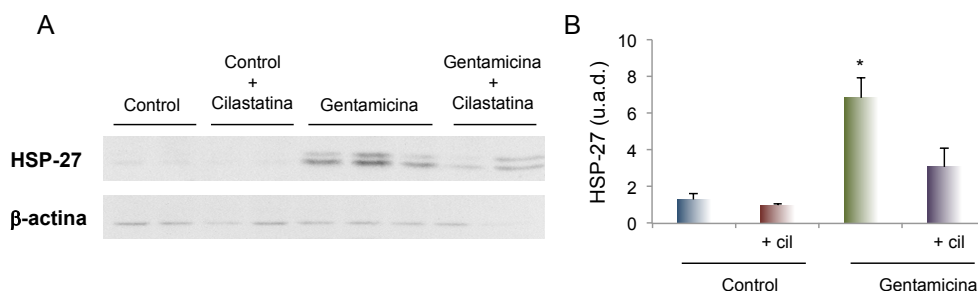


FIGURA 42. Efecto de gentamicina y cilastatina sobre la síntesis de HSP-27 en tejido renal. A) Imágenes representativas de western blot de HSP-27 y β -actina (control de carga) en muestras de corteza renal. B) Cuantificación del densitometrado del western blot realizado y corregido por el control de carga. Se observa un aumento significativo de HSP-27 en las muestras del grupo gentamicina con respecto a los grupos control. El tratamiento con cilastatina inhibió la síntesis de HSP-27. Los resultados se expresan como la media \pm EEM de $n=6-8$ animales por grupo. * $p \leq 0.005$ vs resto de los grupos. Cil: cilastatina, u.a.d.: unidades arbitrarias de densitometrado.

1.4.5.- Cilastatina impide el descenso de HSP-70

Se analizaron los niveles de expresión de HSP-70 mediante western blot en corteza renal observando que los animales tratados con gentamicina reducen la expresión de la proteína de manera significativa. Por el contrario, su coadministración con cilastatina permitió recuperar parcial y significativamente sus valores de expresión (Figura 43).

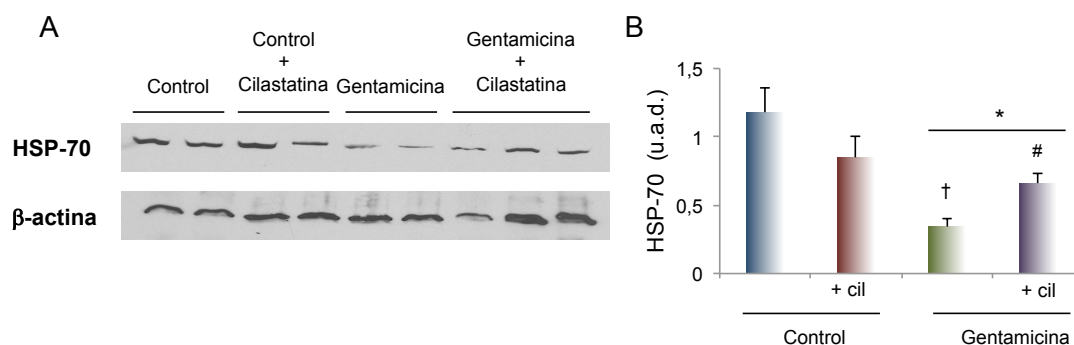


FIGURA 43. Efecto de gentamicina y cilastatina sobre la síntesis de HSP-70 en tejido renal. A) Imágenes representativas de western blot de HSP-70 y β-actina (control de carga) en muestras de corteza renal. B) Cuantificación del densitometrado del western blot realizado y corregido por el control de carga. El grupo gentamicina disminuye la expresión de HSP-70 con respecto a los demás grupos. Los animales tratados con gentamicina y cilastatina recuperan parcialmente los niveles de expresión aunque sin alcanzar los valores de los grupos control. Los resultados se expresan como la media ± EEM de n=6-8 animales por grupo. *p ≤ 0.05 vs control, #p ≤ 0.05 vs grupo gentamicina, †p ≤ 0.005 vs control + cilastatina. Cil: cilastatina, u.a.d.: unidades arbitrarias de densitometrado.

1.4.6.- Cilastatina reduce la peroxidación lipídica. Disminución de la aparición de 4-hidroxi-2-nonenal

La peroxidación lipídica o degradación oxidativa de los lípidos es el proceso por el cual los radicales libres capturan electrones de los lípidos en las membranas celulares, quedando como ácido graso radical, que reacciona con otro lípido de la membrana generando una reacción en cadena como resultado del EO. Durante la peroxidación lipídica aumentan los niveles de síntesis de 4-HNE, un metabolito producto de la descomposición de ácidos grasos poliinsaturados y por tanto, niveles elevados indican un aumento de EO a nivel lipídico en la célula. Por este motivo decidimos estudiar este proceso analizando mediante inmunolocalizaciones la presencia de 4-HNE en los diferentes grupos en secciones parafinadas de corteza renal (Figura 44). Se observa un aumento del metabolito en los animales tratados con gentamicina con respecto a los grupos controles. El cotratamiento con cilastatina redujo considerablemente los niveles de 4-HNE.

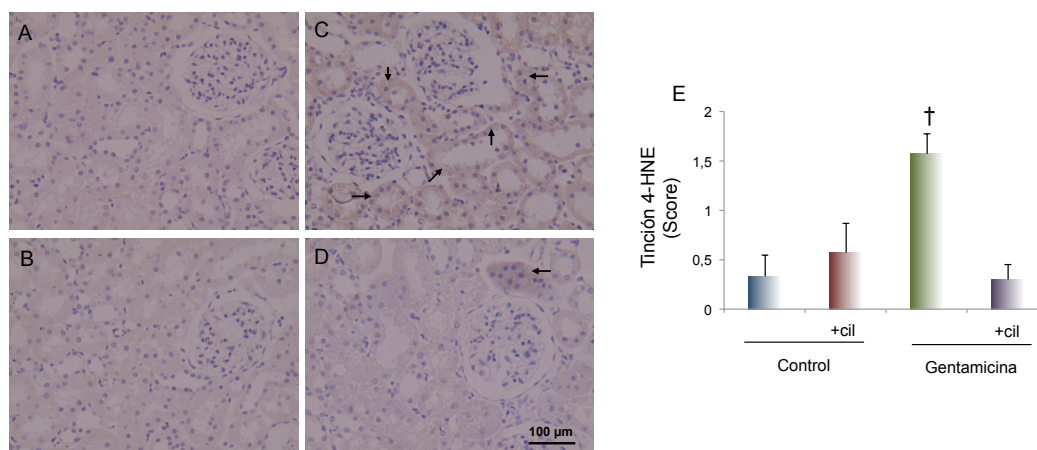


FIGURA 44. Efecto de gentamicina y cilastatina sobre la aparición de 4-HNE en tejido renal. (A-D) Imágenes representativas de inmunolocalizaciones de 4-HNE en secciones de corteza renal. Las imágenes corresponden a grupo control (A), control + cilastatina (B), gentamicina (C) y gentamicina + cilastatina (D). Se aprecia un aumento en la síntesis de esta proteína en animales tratados con gentamicina. Cilastatina disminuyó la peroxidación significativamente, mientras que los controles quedan ausentes del EO a nivel lipídico. Magnificación 20X. Estimación semicuantitativa de la inmunotinción de 4-HNE (E). Los resultados se expresan como la media \pm EEM de $n=6-8$ animales por grupo. Las flechas marcan la presencia de 4-HNE en las células tubulares proximales. $\dagger p \leq 0.005$ vs resto de grupos. Cil: cilastatina.

1.5.- Efecto de cilastatina en la respuesta inflamatoria y fibrótica

La inflamación es una respuesta inespecífica frente a agresiones del medio como consecuencia de agentes inflamatorios. La respuesta inflamatoria tiene lugar únicamente en tejidos conectivos y vascularizados para aislar y destruir el agente nocivo así como para reparar el tejido dañado. Por su parte, la fibrosis es la formación excesiva de tejido conectivo fibroso en un órgano o tejido como consecuencia de un proceso reparativo o reactivo. La fibrosis se produce por un proceso inflamatorio crónico lo que desencadena un aumento en la producción de proteínas en la matriz extracelular.

1.5.1.- Cilastatina disminuye la síntesis de $TNF\alpha$

$TNF\alpha$ es una citoquina segregada por las células del sistema inmune cuando se produce un proceso inflamatorio. Se analizó la concentración de esta citoquina a nivel proteico (Figura 45A) y a nivel transcripcional (Figura 45B) en el tratamiento con gentamicina a fin de cuantificar la inflamación producida y el efecto generado por cilastatina. Los resultados encontrados en los sueros muestran un aumento de los niveles de $TNF\alpha$ en los animales tratados con gentamicina. Sin embargo, la coadministración con cilastatina logró reducir los valores de $TNF\alpha$ hasta los niveles basales encontrados en los controles, demostrando un descenso del proceso inflamatorio (Figura 45A). En contraste, gentamicina aumentó los niveles de ARNm de

TNF α pero en este caso, cilastatina no fue capaz de recuperarlos siendo significativamente distintos a los de los controles (Figura 45B).

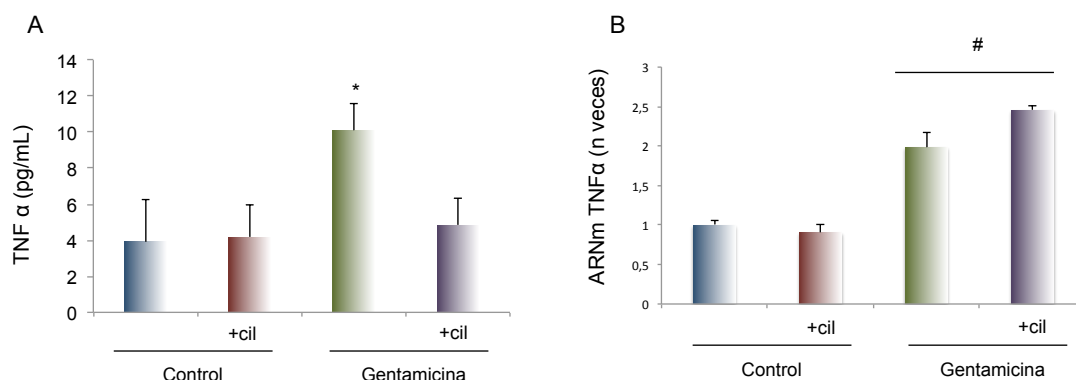


FIGURA 45. Efecto de gentamicina y cilastatina sobre la presencia de TNF α en suero (A) y sobre la regulación transcripcional del gen (B) en corteza renal. Los animales tratados con gentamicina aumentaron los niveles de concentración de TNF α a nivel proteico. El tratamiento de gentamicina con cilastatina recuperó totalmente la citoquina hasta los niveles basales encontrados en los controles. A nivel génico, gentamicina aumento los niveles de expresión de TNF α de manera significativa. Su coadministración con cilastatina no fue capaz de generar ningún cambio. Los resultados se expresan como la media \pm EEM de n=6-8 animales por grupo. *p \leq 0.05 vs resto de los grupos, #p \leq 0.001 vs control y control + cilastatina. Cil: cilastatina.

1.5.2.- Cilastatina reduce la presencia de monocito/macrófago

Los monocitos son un tipo de glóbulos blancos presentes en las células sanguíneas. Cuando un tejido sufre algún proceso inflamatorio, los monocitos se diferencian a macrófagos fagocitando proteínas, fosfolípidos, etc. que constituirán la respuesta inflamatoria. La presencia en los tejidos de monocitos y macrófagos puede ser analizada mediante la presencia de un marcador de superficie, CD68 que es una glicoproteína expresada en la membrana plasmática de los macrófagos cuya función es la captación de lipoproteínas de baja densidad (LDL). Por lo tanto, se estudió su concentración en muestras parafinadas de corteza renal como otro parámetro del proceso inflamatorio (Figura 46). El grupo gentamicina (Figura 46C) se caracteriza por la presencia de numerosas células de infiltrado inflamatorio en el tejido mientras que los animales a los que se le suministró gentamicina y cilastatina conjuntamente redujeron casi por completo la presencia de dichas células (Figura 46D).

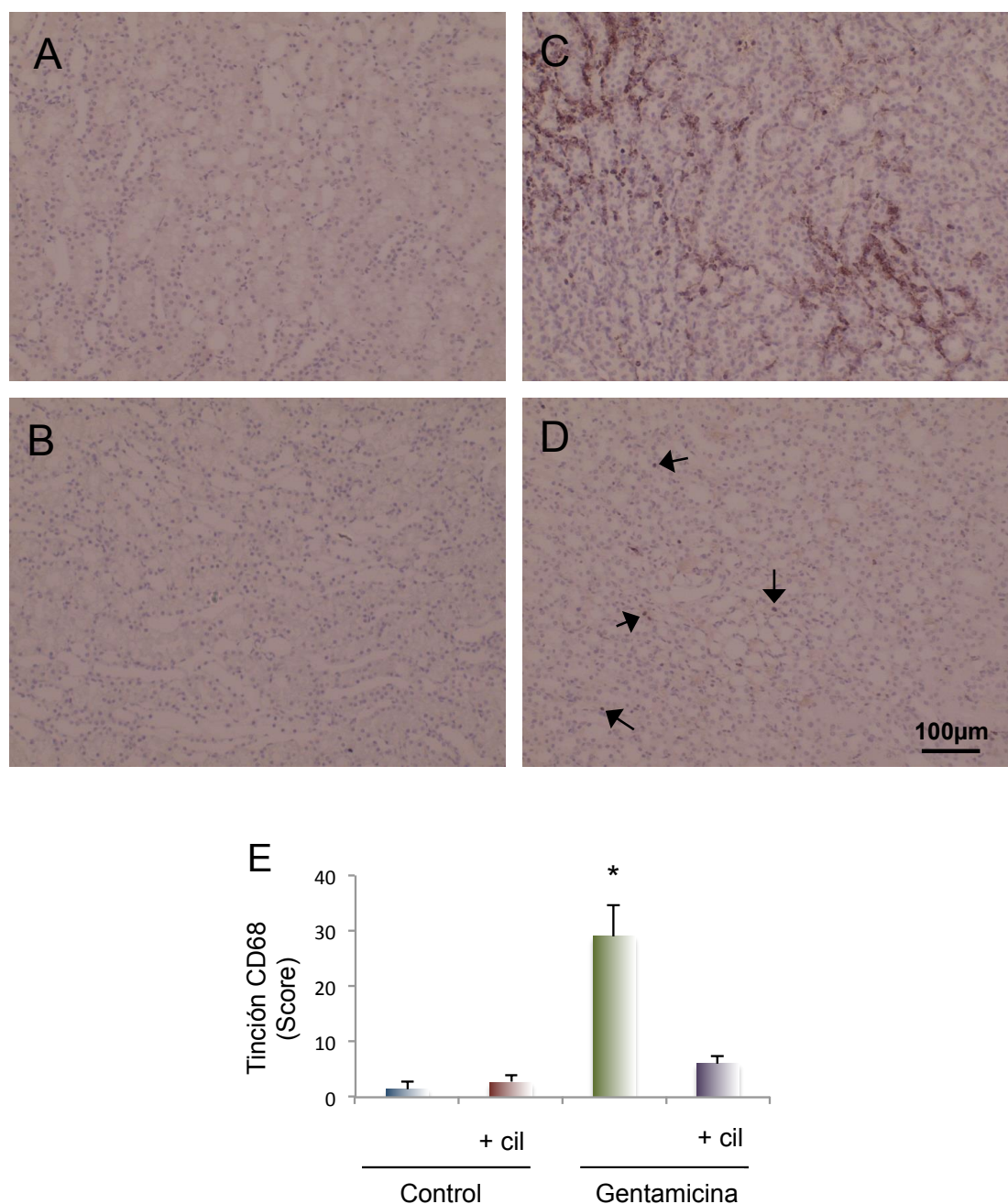


FIGURA 46. Efecto de gentamicina y cilastatina sobre la presencia de CD68 en tejido renal. (A-D) Imágenes representativas de inmunolocalizaciones de CD68 en secciones de tejido renal. Las imágenes corresponden a grupo control (A), control + cilastatina (B), gentamicina (C), gentamicina + cilastatina (D). Estimación semicuantitativa o “score” de la tinción de CD68 (E). Se aprecia un aumento del infiltrado inflamatorio en animales tratados con gentamicina. La coadministración con cilastatina permitió un descenso muy notorio de la presencia de macrófagos hasta alcanzar valores cercanos a los de los controles. Magnificación de las inmunolocalizaciones 20X. Los resultados se expresan como la media \pm EEM de n=6-8 animales por grupo. * $p \leq 0.005$ vs resto de grupos. Las flechas marcan la presencia de CD68 en las células tubulares proximales. Cil: cilastatina

1.5.3.- Efecto de cilastatina sobre citoquinas proinflamatorias

Las quimioquinas son proteínas de pequeño tamaño pertenecientes a la familia de las citoquinas que juegan un papel fundamental en la adhesión selectiva de monocitos, neutrófilos y linfocitos. Una de las quimioquinas más importantes es MCP-1 cuya

función es regular la migración e infiltración de monocitos/macrófagos³⁴. Dada su importancia en el proceso inflamatorio, se midió la concentración de MCP-1 presente tanto en la orina (Figura 47A) como en el suero (Figura 47B) de los animales de los diferentes grupos estudiados. Los resultados mostraron que tanto en orina como en suero, MCP-1 aumentó significativamente cuando los animales fueron tratados con gentamicina con respecto a los controles. La coadministración con cilastatina supuso una recuperación total de la concentración de la citoquina (medida en orina) y parcial aunque significativa (medida en suero) con respecto a los grupos control.

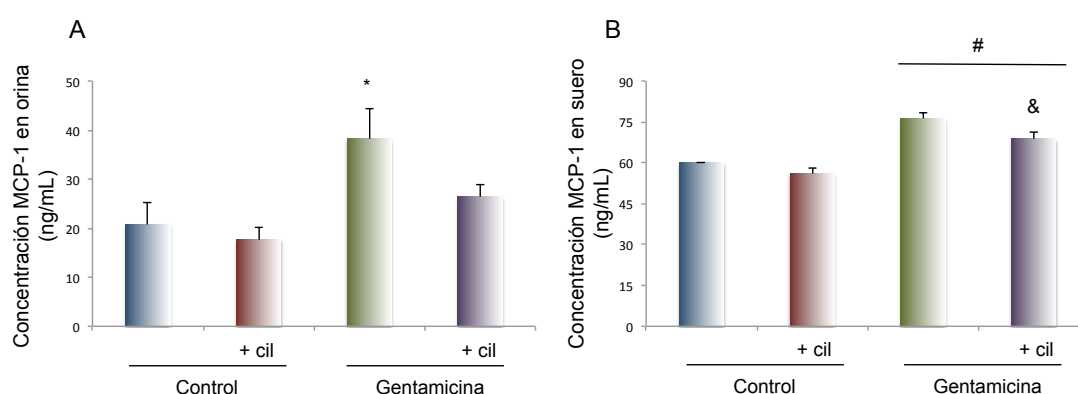


FIGURA 47. Efecto de gentamicina y cilastatina sobre la concentración de MCP-1 en orina (A) y suero (B). En ambos casos, gentamicina aumentó la concentración de MCP-1 respecto a los controles. Cilastatina consiguió disminuir los valores aumentados significativamente en ambos casos. Los resultados se expresan como la media \pm EEM de $n=6-8$ animales por grupo. * $p \leq 0.05$ vs resto de grupos, # $p \leq 0.05$ vs control y control + cilastatina, & $p \leq 0.05$ vs gentamicina. Cil: cilastatina.

Tras la medición de MCP-1 a nivel proteico en muestras de suero y orina, se procedió a la determinación de su expresión génica mediante RT-PCR para ver el efecto producido por gentamicina así como su administración conjunta con cilastatina. Además, también se midieron 2 citoquinas proinflamatorias, como son IL-1 β (producida por la actuación de macrófagos y células epiteliales, actuando junto a TNF en la inmunidad innata e inflamación) e IL-6 (segregada por macrófagos para estimular el crecimiento y diferenciación tanto de linfocitos T como C). Los resultados mostrados en la Figura 48 indican que gentamicina produce un aumento de los niveles de expresión de los genes. El tratamiento con cilastatina redujo completamente la expresión de MCP-1 y IL-6 (Figura 48A y C) hasta alcanzar los valores de los grupos control y de manera parcial aunque significativa la expresión de IL-1 β (Figura 48B).

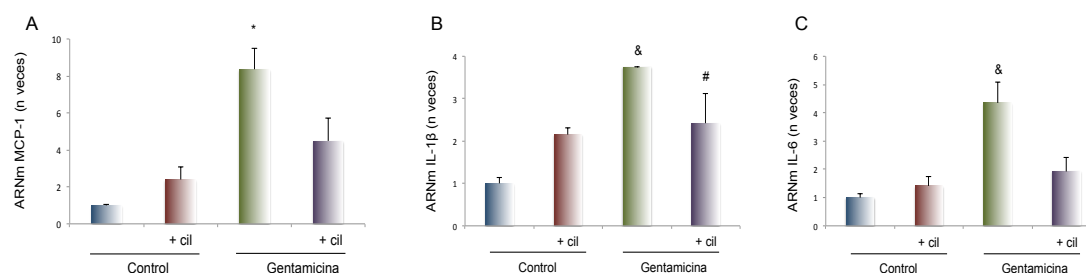


FIGURA 48. Efecto de gentamicina y cilastatina sobre la regulación transcripcional de los genes de MCP-1 (A), IL-1β (B) e IL-6 (C) en corteza renal. Sus expresiones fueron analizadas por RT-PCR cuantitativa. Gentamicina aumentó los niveles de expresión de los genes con respecto a los controles significativamente. La coadministración con cilastatina recuperó completamente la expresión de MCP-1 e IL-6 hasta alcanzar los valores de los grupos controles y parcial aunque significativamente la expresión de IL-1β con respecto a los animales tratados con gentamicina. Los resultados se expresan como la media \pm EEM de $n=6-8$ animales por grupo. * $p \leq 0.01$ vs resto de grupos, & $p \leq 0.05$ vs resto de grupos, # $p \leq 0.05$ vs control. Cil: cilastatina.

1.5.4.- Cilastatina disminuye la producción de VCAM-1

Las moléculas de adhesión celular son proteínas transmembrana presentes en leucocitos y células endoteliales cuya función es la de unir células entre sí o con la matriz extracelular en los procesos denominados de adhesión celular. La adhesión leucocitaria se incrementa cuando un tejido sufre un proceso inflamatorio por lo que el estudio de alguna de estas moléculas de adhesión resultó también clave para conocer el efecto que cilastatina ejercía ante el proceso inflamatorio tras la administración de gentamicina. Para ello estudiamos VCAM-1 (*Vascular Cell Adhesion Molecule 1*) mediante inmunohistoquímica en secciones de corteza renal parafinadas del modelos animal. Las imágenes obtenidas muestran un aumento en la síntesis de VCAM-1 en los tejidos de los animales del grupo gentamicina en comparación con los controles (Figura 49C). No obstante, cilastatina permitió una recuperación de la concentración de esta molécula de adhesión (Figura 49D). La inmunolocalización fue cuantificada mostrando los resultados en la Figura 49E.

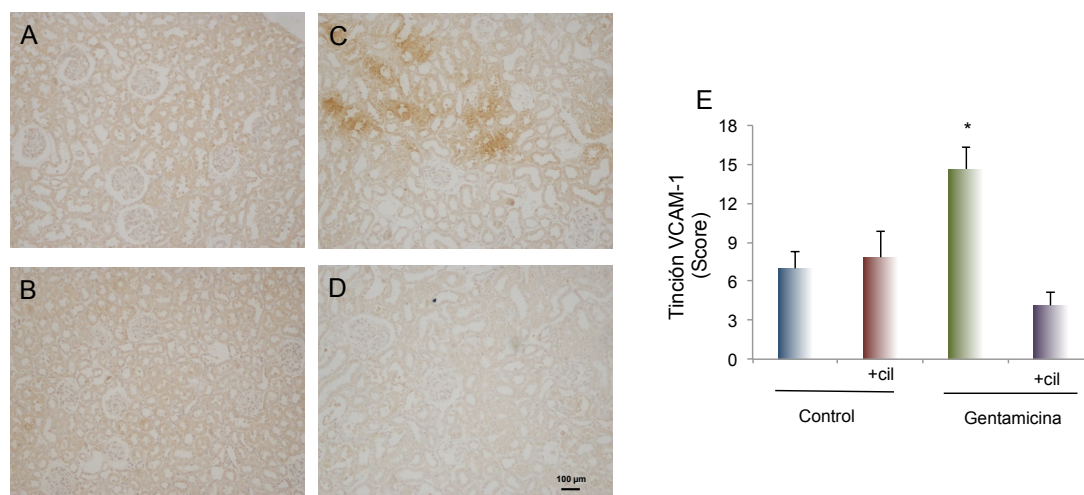


FIGURA 49. Efecto de gentamicina y cilastatina sobre la concentración de VCAM-1 en tejido renal. (A-D) Imágenes representativas de inmunolocalizaciones de VCAM-1 en secciones de tejido renal. Las imágenes corresponden a grupo control (A), control + cilastatina (B), gentamicina (C), gentamicina + cilastatina (D). Estimación semicuantitativa o “score” de la inmunolocalización de VCAM-1 (E). Se aprecia un aumento en la síntesis de esta molécula de adhesión en animales tratados con gentamicina. La coadministración con cilastatina permitió un descenso muy notorio de VCAM-1 hasta alcanzar valores cercanos a los controles. Magnificación de las inmunolocalizaciones 10X. Los resultados se expresan como la media \pm EEM de n=6-8 animales por grupo. *p \leq 0.01 vs resto de grupos. Cil: cilastatina

1.5.5.- Efecto de cilastatina sobre la formación de fibrosis

Se realizaron estudios mediante tinción de rojo sirio para ver si existía un aumento en la formación de fibras de colágeno demostrando la presencia de fibrosis en el tejido renal. Los resultados analizados por patólogos mostraron que no existían diferencias significativas entre los distintos grupos aunque como se observa en la Figura 50, si que existe una tendencia en la formación de fibrosis en animales tratados con gentamicina (Figura 50C) superior a la del resto de los grupos en los que no hubo prácticamente tinción. Esto hace suponer que el corto tiempo empleado en el modelo no permitió el desarrollo de fibrosis en los animales tratados con gentamicina aunque sí indicios que sugieren que a tiempos mayores gentamicina podría provocar la fibrosis, y quizá cilastatina fuera capaz de bloquear dicha acción. Para detectar si esto podría ocurrir de esta manera, se analizaron dos moléculas muy implicadas en el desarrollo de la fibrosis como son TGF β y CTGF.

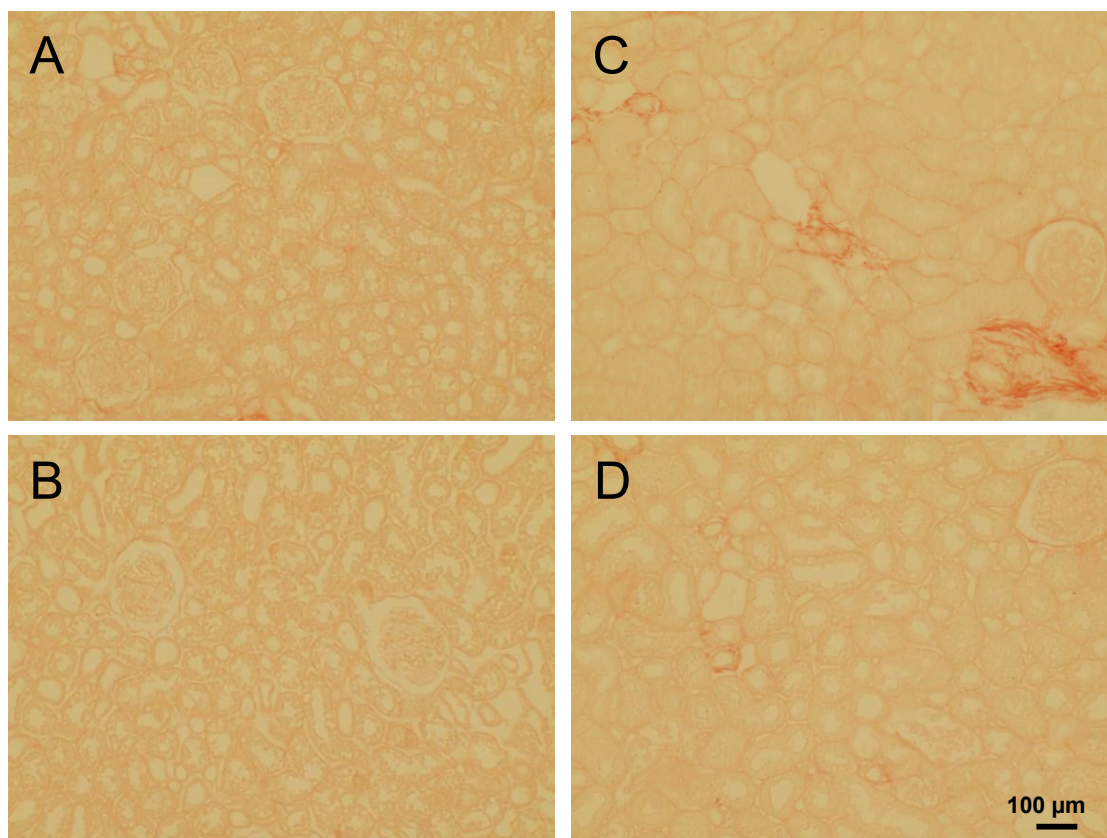


FIGURA 50. Efecto de gentamicina y cilastatina sobre la evaluación histológica de fibrosis renal. (A-D) Imágenes representativas de inmunolocalizaciones de fibras de colágeno mediante la técnica de rojo sirio en secciones parafinadas de tejido renal. Las imágenes corresponden a grupo control (A), control + cilastatina (B), gentamicina (C), gentamicina + cilastatina (D). Se aprecia un pequeño aumento en la síntesis de colágeno en animales tratados con gentamicina que no llegó a ser significativo. Magnificación de las inmunolocalizaciones 10X. Los resultados se expresan como la media \pm EEM de $n=6-8$ animales por grupo.

1.5.6.- Cilastatina inhibe la síntesis de $TGF\beta$

$TGF\beta$ es una citoquina que participa en importantes procesos de crecimiento, diferenciación y homeostasis a través de su interacción con receptores de la membrana celular¹²⁶. En los mecanismos implicados en la fibrosis, se sabe que $TGF\beta$ tiene una gran importancia¹²⁶. Se estudió la expresión de $TGF\beta$ mediante inmunolocalizaciones en muestras de tejido renal incluidas en parafina (Figura 51). Los resultados muestran un aumento de expresión de $TGF\beta$ en respuesta al daño generado por gentamicina. La concentración de la proteína se redujo significativamente en los animales que fueron tratados conjuntamente con gentamicina y cilastatina (Figura 51D).

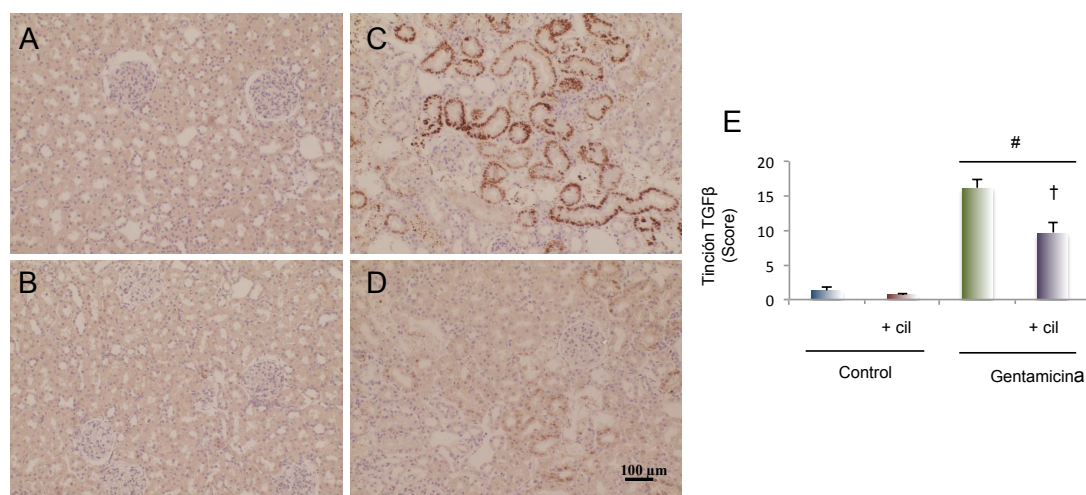


FIGURA 51. Efecto de gentamicina y cilastatina sobre la síntesis de TGFβ en tejido renal. (A-D) Imágenes representativas de inmunolocalizaciones de TGFβ en secciones de tejido renal. Las imágenes corresponden a grupo control (A), control + cilastatina (B), gentamicina (C), gentamicina + cilastatina (D). Estimación semicuantitativa o “score” de la inmunolocalización de TGFβ (E). Se aprecia un aumento en la síntesis de esta proteína en animales tratados con gentamicina. Los animales del grupo gentamicina + cilastatina experimentaron un descenso muy notorio en la presencia de TGFβ. Magnificación de las inmunolocalizaciones 10X. Los resultados se expresan como la media ± EEM de n=6-8 animales por grupo. #p ≤ 0.001 vs grupo control y control + cilastatina, †p ≤ 0.05 vs gentamicina. Cil: cilastatina.

Dada la importancia de TGFβ en el proceso fibrótico y para corroborar los resultados obtenidos por inmunohistoquímica, se midió su concentración en la orina de los animales (Figura 52A) y se cuantificó su expresión génica mediante RT-PCR en corteza renal. Los resultados de la Figura 52A muestran como gentamicina aumenta los niveles de TGFβ de manera muy significativa con respecto a los controles, mientras que en su tratamiento conjunto con cilastatina, la concentración de la citoquina recupera total y significativamente los niveles presentes en los animales control. Los hallazgos encontrados a nivel transcripcional y mostrados en la Figura 52B, mostraron exactamente los mismos resultados.

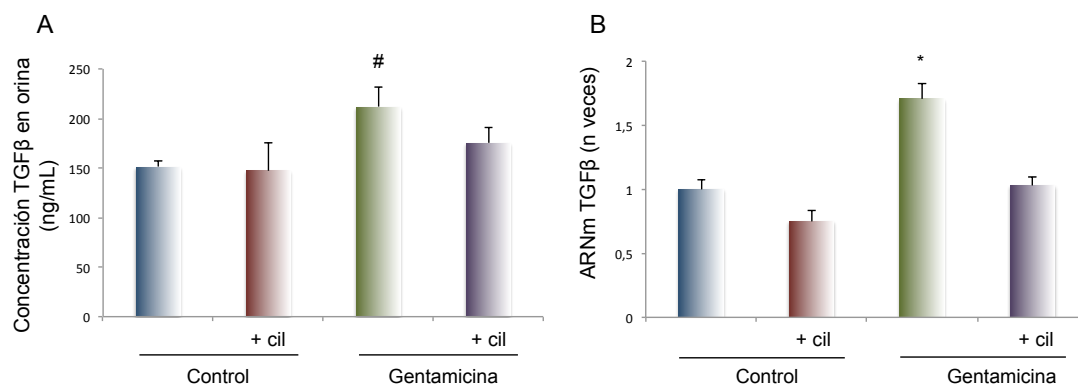


FIGURA 52. Efecto de gentamicina y cilastatina sobre la concentración de TGFβ en orina (A) y sobre la regulación transcripcional del gen de TGFβ en corteza renal (B). Los datos obtenidos a nivel proteico en muestras de orina muestran un aumento significativo de la concentración de TGFβ en los animales tratados con gentamicina con respecto a los grupos control. Cilastatina consiguió reducir los niveles de la citoquina hasta los valores basales. Su expresión génica fue analizada por RT-PCR cuantitativa. Gentamicina aumentó los niveles de expresión del gen con respecto a los controles significativamente. La coadministración con cilastatina supuso el descenso de la expresión génica de manera significativa hasta los valores encontrados en los controles. Los resultados se expresan como la media \pm EEM de $n=6-8$ animales por grupo. [#] $p \leq 0.05$ vs resto de grupos, ^{*} $p \leq 0.001$ vs resto de grupos. Cil: cilastatina.

1.5.7.- Cilastatina disminuye la producción de CTGF

CTGF aparece aumentado en patologías asociadas a la fibrosis¹³⁹. Su expresión está regulada por diversos factores implicados en el proceso inflamatorio como la angiotensina II o TGFβ y por tanto participa en el inicio y progresión del daño renal al ser capaz de inducir respuesta inflamatoria y promover la fibrosis, señalándole como una posible diana terapéutica en el tratamiento de patologías renales¹³⁹. Los resultados obtenidos mediante inmunohistoquímica en tejido renal mostraron un aumento de expresión de CTGF en los tejidos de los animales tratados con gentamicina (Figura 53C) que se correlacionan perfectamente con los elevados niveles proinflamatorios de TGFβ mostrados anteriormente. Cilastatina fue capaz de inhibir totalmente la síntesis de CTGF (Figura 53D).

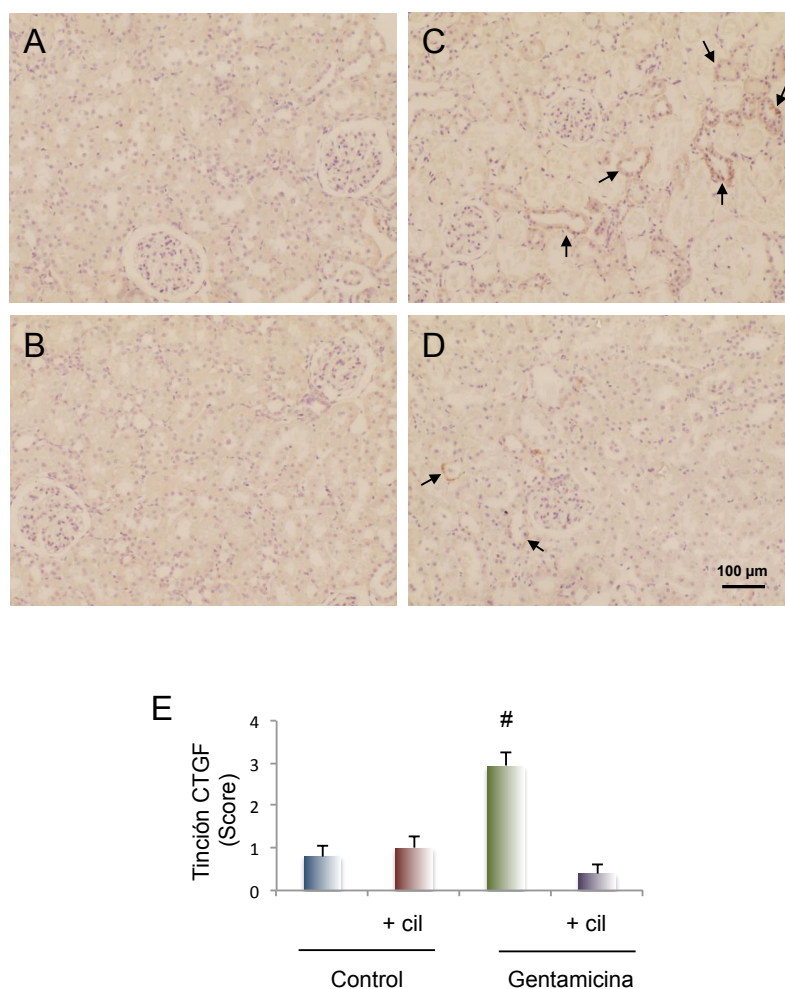


FIGURA 53. Efecto de gentamicina y cilastatina sobre la expresión de CTGF en tejido renal (A-D) Imágenes representativas de inmunolocalizaciones de CTGF en secciones de tejido renal. Las imágenes corresponden a grupo control (A), control + cilastatina (B), gentamicina (C), gentamicina + cilastatina (D). Estimación semicuantitativa o “score” de la inmunolocalización de CTGF (E). Se aprecia un aumento en la expresión de esta proteína en animales tratados con gentamicina. La coadministración con cilastatina supuso un descenso muy notorio de la presencia de CTGF disminuyendo su nivel hasta los valores de los animales no tratados. Magnificación de las inmunolocalizaciones 10X. Los resultados se expresan como la media \pm EEM de $n=6-8$ animales por grupo. # $p \leq 0.05$ resto de grupos. Las flechas marcan la presencia de CTGF en las células tubulares proximales. Cil: cilastatina.

1.6.- Efecto de cilastatina sobre la acumulación de gentamicina a nivel renal

1.6.1.- Efecto de cilastatina sobre la entrada de gentamicina

Como ya se hizo en el modelo *in vitro*, se determinó la concentración de gentamicina en el riñón en las muestras obtenidas tras el sacrificio de los animales. En la Figura 54, se observa como la acumulación de gentamicina en los riñones de los animales de dicho grupo es muy elevada. Su coadministración con cilastatina supuso una disminución significativa de la concentración de fármaco.

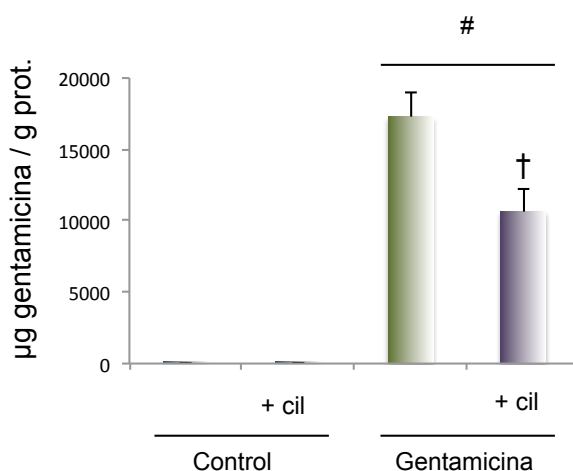


FIGURA 54. Efecto de gentamicina y cilastatina sobre la acumulación de gentamicina en riñón. Los animales tratados con gentamicina y cilastatina presentaron niveles de concentración de gentamicina significativamente menor que los animales tratados únicamente con gentamicina. Los resultados se expresan como la media \pm EEM de $n = 6-8$ animales por grupo. # $p \leq 0.005$ vs control y control + cilastatina, † $p \leq 0.001$ vs gentamicina. Cil: cilastatina.

1.6.2.- Efecto de cilastatina sobre el transportador de gentamicina: megalina

Como ya se explicó en *Introducción*, el mecanismo por el cual gentamicina se introduce al interior de la célula tubular es mediante la acción de una proteína localizada en los *lipid rafts* denominada megalina^{70,143}. Debido a la gran acumulación de gentamicina en los animales tratados con el fármaco, se quiso conocer los niveles de expresión del transportador, así como observar los cambios ocurridos cuando se coadministraba con cilastatina. Como puede observarse en la Figura 55A-D, la concentración de megalina se vio considerablemente aumentada en los animales tratados con gentamicina con respecto a los controles, siendo totalmente lógico este aumento, y correlacionándose con la mayor entrada de gentamicina en las células

renales. La administración de cilastatina disminuyó su presencia en las PTEC, traducándose en una menor entrada celular del antibiótico (Figura 55D). La cuantificación de la inmunotinción corroboró los resultados como puede observarse en la Figura 55E.

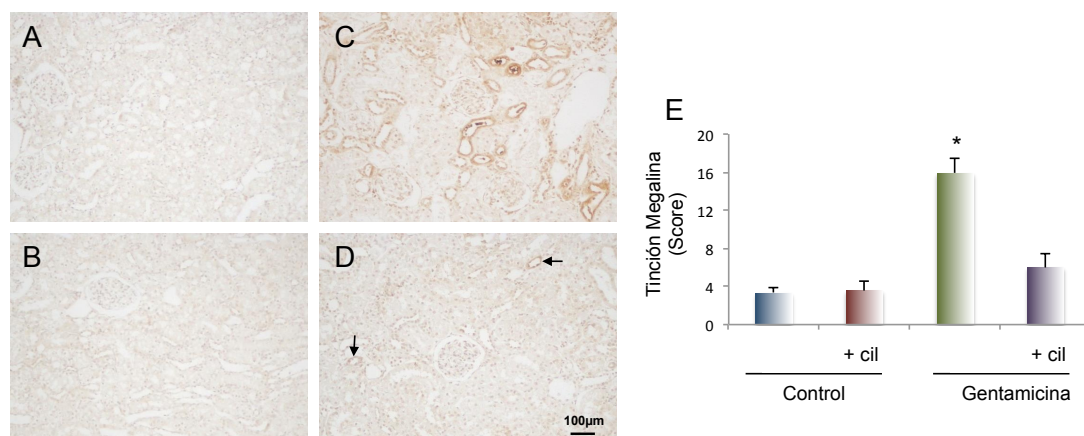


FIGURA 55. Efecto de gentamicina y cilastatina sobre la expresión de megalina en tejido renal. (A-D) Imágenes representativas de inmunolocalizaciones de megalina en secciones de tejido renal. Las imágenes corresponden a grupo control (A), control + cilastatina (B), gentamicina (C), gentamicina + cilastatina (D). Estimación semicuantitativa o "score" de la inmunolocalización de megalina (E). Se aprecia un aumento en la síntesis de esta proteína en animales tratados con gentamicina. Los animales del grupo gentamicina + cilastatina experimentaron un descenso muy notorio en la presencia de megalina mostrando valores como los de los animales no tratados e impidiendo por tanto la entrada de gentamicina al riñón. Magnificación de las inmunolocalizaciones 10X. Las flechas marcan la presencia de megalina en las células tubulares proximales. Cil: cilastatina.

Además, también se quiso comprobar si cilastatina ejercía algún efecto a nivel transcripcional sobre la expresión de megalina ya que podría influir en la entrada de gentamicina al interior celular. Los resultados obtenidos en la Figura 56 muestran que gentamicina disminuye los niveles de expresión génica de manera muy significativa con respecto a los grupos control. La coadministración del fármaco con cilastatina no supuso cambio alguno en la expresión del gen con respecto a los animales del grupo gentamicina.

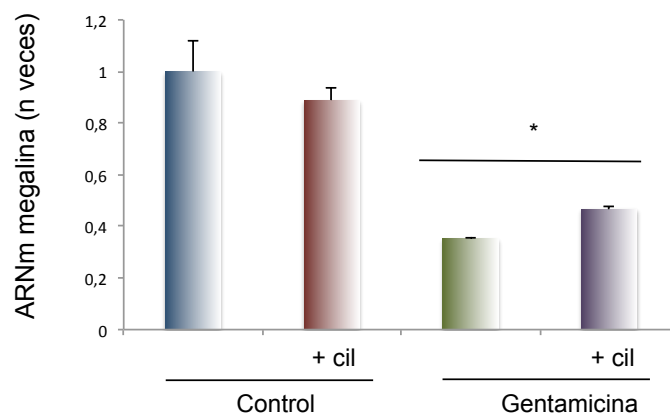


FIGURA 56. Efecto de gentamicina y cilastatina sobre la regulación transcripcional del gen de megalina en corteza renal. Su expresión fue analizada por RT-PCR cuantitativa. Gentamicina disminuyó los niveles de expresión del gen con respecto a los controles significativamente. La coadministración con cilastatina no provocó cambio alguno con respecto al tratamiento únicamente con gentamicina. Los resultados se expresan como la media \pm EEM de $n=6-8$ animales por grupo. * $p \leq 0.001$ vs control y control + cilastatina. Cil: cilastatina.

VI.III.- RESULTADOS EXPERIMENTOS EN BACTERIAS

1.- Efecto de cilastatina sobre la capacidad bactericida de gentamicina

Para determinar si cilastatina ejercía algún efecto en el poder terapéutico antibacteriano de gentamicina, se evaluó (en su presencia y ausencia) la susceptibilidad antimicrobiana de dos cepas diferentes de bacterias sensibles a gentamicina como son *S. aureus* y *E. coli* utilizando la CMI y la CMB. Uno de los controles previos realizados durante el ensayo era la observación tanto de la pureza de los inóculos ensayados en los experimentos, como de su concentración. Como puede observarse en la Figura 57, no hubo contaminaciones de otros tipos bacterianos durante la realización de ninguno de los experimentos realizados, estando confirmado este hecho además por la Dra. Emilia Cercenado del Departamento de Microbiología Clínica del HGUGM. Asimismo, en la misma inspección visual de las placas pudo comprobarse como aparentemente cilastatina no ejercía ningún tipo de efecto en el crecimiento de las colonias bacterianas que atendiera a su número o a su forma.

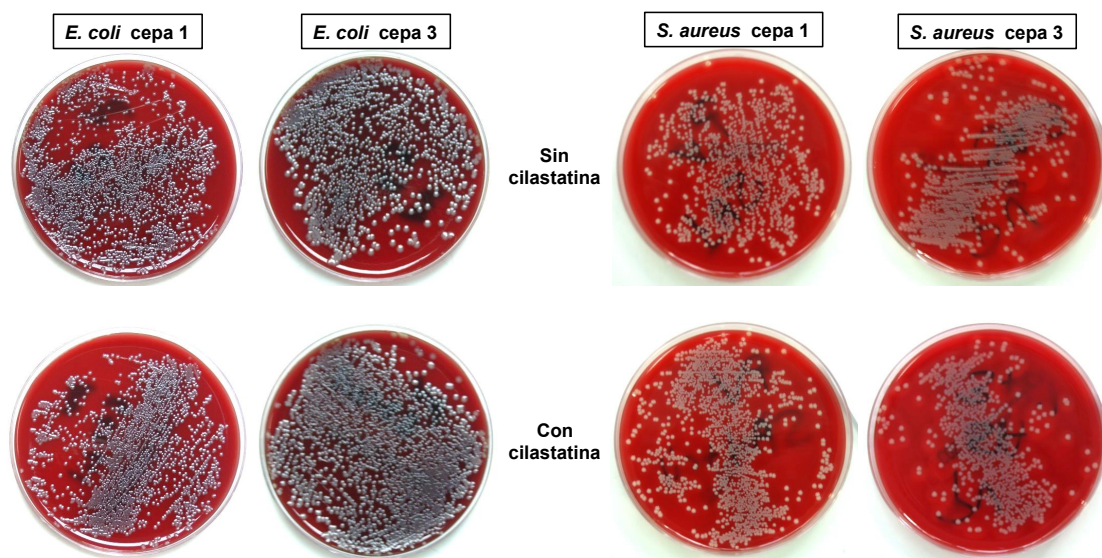


Figura 57. Verificación de la pureza de los inóculos bacterianos. Ejemplos del crecimiento bacteriano en placas de agar/sangre de dos cepas diferentes de *Staphylococcus aureus* y de *Escherichia coli* para la comprobación de la pureza de los inóculos en los experimentos realizados para la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Mínima Bactericida (CMB). 10 µL de las preparaciones de los inóculos que fueron cargados en la placa para la determinación de la CMI y la CMB (50 µL de los inóculos con una densidad equivalente a 0.5 McFarland en 5 mL de caldo Mueller-Hinton) se sembraron en placas de agar/sangre y se incubaron durante 24 horas a 35°C en presencia o ausencia de cilastatina (200 µg/mL). Como puede observarse no se apreciaron contaminaciones, y el crecimiento fue igual en presencia o ausencia de cilastatina.

Resultados – Experimentos en bacterias

El conteo de las colonias bacterianas en las distintas cepas de *E. coli* y de *S. aureus* para la comprobación de la concentración de los inóculos fue similar en todos los casos, no habiendo diferencias de crecimiento significativas entre las bacterias que crecían con cilastatina o sin ella. Todas las preparaciones demostraron un conteo de colonias de entre 60 y 140 óptimo para la realización de los experimentos (esquema visual de la Figura 58). Como tanto la pureza de los microorganismos como su concentración eran idóneas, procedimos a calcular la concentración que inhibía el crecimiento visible de los microorganismos, es decir la CMI de la gentamicina, así como la CMB. Un ejemplo de cómo determinamos estos parámetros en presencia y ausencia de la cilastatina puede observarse en la Figura 58.

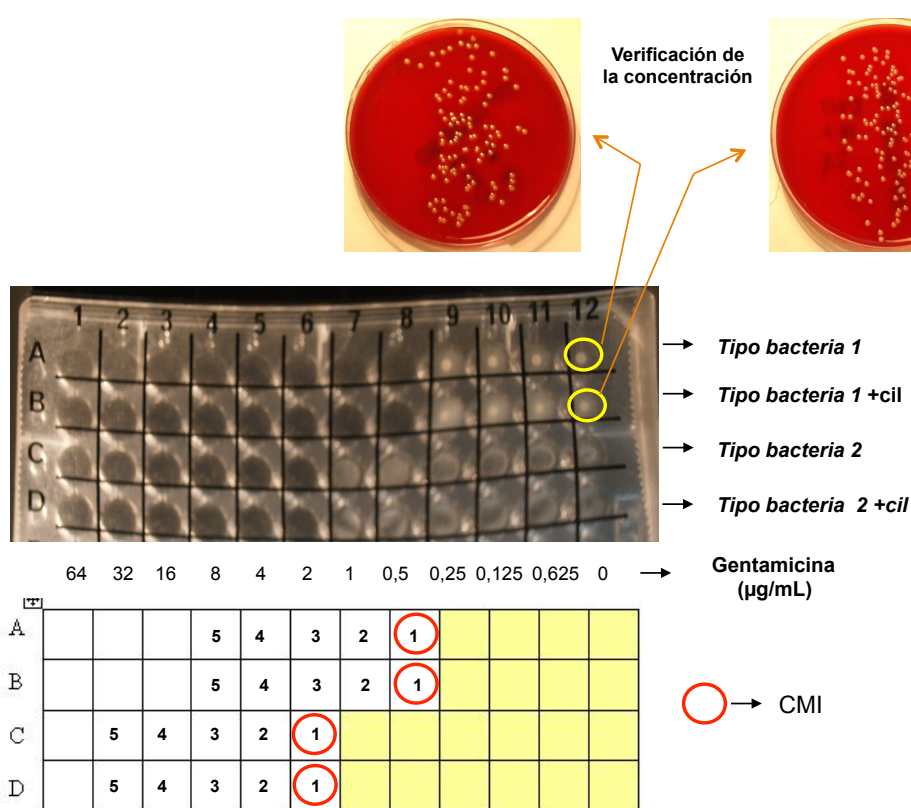


Figura 58. Cálculo de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB). Ejemplo de los experimentos realizados para el cálculo de los parámetros de sensibilidad bacteriana a gentamicina en presencia o ausencia de cilastatina (200 µg/ml). En la placa se muestra el crecimiento de las bacterias ejemplo tipo 1 y 2 con y sin cilastatina, y aquellos pocillos en los que no se aprecia crecimiento bacteriano es la CMI de la gentamicina. En el diagrama, la CMI está representada en círculos rojos. Los números 1 al 5 situados en los pocillos siguientes del diagrama inferior, hacen referencia, a que el volumen contenido en esos pocillos fue recogido y sembrado cada uno de ellos en placas de agar sangre, para contar el número de colonias presentes en cada uno, y calcular con esos valores la CMB. En la parte superior, puede verse un ejemplo del control de la concentración de las colonias. 10 µl de los pocillos control de crecimiento (círculos amarillos; gentamicina 0 µg/ml) son tomados y mezclados con 5 ml de agua destilada estéril, y de esta mezcla 100 µl son sembrados en placas de agar sangre, para el conteo de colonias, obteniendo resultados visuales parecidos a estos. Cil, cilastatina.

Resultados – Experimentos en bacterias

Los resultados que encontramos están referidos en las Tablas 14 y 15. Puede observarse como en la mayor parte de los resultados obtenidos para *S. Aureus* (Tabla 14), la CMI es idéntica en presencia o ausencia de cilastatina, no afectando por tanto, la presencia de ésta. Los resultados obtenidos para *E. coli* (Tabla 15) muestran en tres de las cepas como hay un cambio de una dilución en la CMI (de 1 a 0.5 µg/mL de gentamicina o viceversa), dos de las cuales la presencia de cilastatina provoca una CMI menor que en su ausencia, pero que no resulta significativa puesto que es aceptado que un cambio de más/menos una dilución no cambia en absoluto el resultado. Al observar las CMB, que es aquella concentración de gentamicina que destruye a más del 99,9% de las bacterias, podemos comprobar como en el caso de *E. coli* (Tabla 14) los valores de la CMB son exactamente idénticos a los del CMI, quedando patente como las bacterias mueren haya o no cilastatina. Resultados idénticos son obtenidos para las cepas de *S. aureus* (Tabla 13) donde no hay cambios en la CMB haya o no cilastatina y los valores son asimismo casi idénticos en todos los grupos a los del CMI, demostrándose como gentamicina a esas dosis es totalmente efectivo en la eliminación de las bacterias, no afectando en ningún caso cilastatina a su poder bacteriostático y bactericida.

| <i>Staphylococcus aureus</i> | <i>Cepa 1</i> | | <i>Cepa 2</i> | | <i>Cepa 3</i> | | <i>Cepa 4</i> | |
|------------------------------|---------------|---------|---------------|---------|---------------|---------|---------------|---------|
| | Sin cil | Con cil | Sin cil | Con cil | Sin cil | Con cil | Sin cil | Con cil |
| CMI | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.25 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 |
| CMB | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 1 | 1 | 0.5 | 0.5 |

TABLA 13. Concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB) de gentamicina en 4 cepas diferentes de *Staphylococcus aureus* en presencia o ausencia de cilastatina. Los resultados muestran que al no producirse cambios en la CMI ni CMB, cilastatina no ejerce modificación alguna en la capacidad antibacteriana de gentamicina. Cil: cilastatina

Resultados – Experimentos en bacterias

| <i>Escherichia coli</i> | <i>Cepa 1</i> | | <i>Cepa 2</i> | | <i>Cepa 3</i> | | <i>Cepa 4</i> | |
|-------------------------|---------------|---------|---------------|---------|---------------|---------|---------------|---------|
| | Sin cil | Con cil | Sin cil | Con cil | Sin cil | Con cil | Sin cil | Con cil |
| CMI | 1 | 0.5 | 1 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 1 |
| CMB | 1 | 0.5 | 1 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 1 |

TABLA 14. Concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB) de gentamicina en 4 cepas diferentes de *Escherichia coli* en presencia o ausencia de cilastatina. Los resultados muestran que al no producirse cambios en la CMI ni CMB, cilastatina no ejerce modificación alguna en la capacidad antibacteriana de gentamicina. Cil: cilastatina

VII.- DISCUSIÓN

1.- Gentamicina como antibiótico y nefrotóxico. Efecto de cilastatina

La gentamicina es un AG que se emplea como antibiótico para tratar diversas enfermedades graves de ojo, piel, pulmón, estómago, vías urinarias y sangre, así como heridas cutáneas.

La historia de los AG comienza en 1944 con el descubrimiento de la estreptomicina. Desde entonces se han ido incorporando numerosos tipos de antibióticos como la gentamicina para el tratamiento de las infecciones causadas por bacilos Gram-negativos representando, en muchos casos, la única alternativa contra gérmenes resistentes a otros antibióticos. Presentan una escasa absorción oral por lo que la administración intravenosa es la más empleada en pacientes con infecciones severas. Su elevado uso en la clínica puso de manifiesto problemas de toxicidad como la nefrotoxicidad y ototoxicidad en el caso de la gentamicina y la resistencia bacteriana y sobreinfección, comprobándose que la molécula no podía ser modificada sin que afectase a su actividad antimicrobiana¹¹⁸. Su utilización está limitada por la nefrotoxicidad que producen, ya que entre el 8-26% de los pacientes que reciben tratamientos con AG durante varios días muestran trastorno renal^{72,84,96} siendo un daño dosis-dependiente y proporcional a la duración de dicho tratamiento, pudiendo incrementarse el número de pacientes afectados en un 50% en períodos prolongados⁹⁰. El nivel celular de antioxidantes determina la susceptibilidad al daño oxidativo. La toxicidad de los AG y del estudiado en esta tesis, la gentamicina, resulta de la aparición de ROS que incluyen al anión superóxido^{74,177}, radicales hidroxilo, H₂O₂ y especies reactivas de nitrógeno (ERN) dando lugar al daño renal.

La gentamicina no suele introducirse en las membranas biológicas al carecer éstas de proteínas transportadoras. Sin embargo, sí producen daño renal exagerado a nivel del túbulo proximal, debido a la presencia de un receptor endocítico no específico llamado megalina localizado en las balsas de colesterol de las PTEC^{23,27,96,143}. La gentamicina no es metabolizada, por lo que se excreta por los riñones de manera inalterada. Sin embargo, una pequeña porción toxicológicamente reseñable, es reabsorbida por las células del túbulo proximal¹¹⁸. Esta reabsorción supone que gentamicina (cargada positivamente) se una a los fosfolípidos con carga negativa

situados en el borde del cepillo de los túbulos renales⁴⁹, como el fosfatidilinositol (localizado en el interior de la membrana), para su posterior internalización por endocitosis^{95,119,141,143,152} mediada por megalina^{29,127}, acumulándose principalmente en los lisosomas, cuyo interior está cargado negativamente provocando el atrapamiento de forma efectiva de gentamicina^{151,152}. La acumulación del fármaco se localiza en la corteza renal, más concretamente en las células del túbulo proximal¹⁵², cuya presencia puede ser del orden de 5-50 veces superior a su presencia en plasma³⁹. Las implicaciones funcionales producidas como consecuencia de la acumulación de gentamicina en los lisosomas suponen la permeabilidad de la membrana y su agregación con las membranas de los lisosomas adyacentes.

Los primeros efectos sintomatológicos de daño renal tras la administración de gentamicina se caracterizan por un aumento de la excreción proteica urinaria y más tarde disminuye la FG, provocando un aumento de NUS y de la creatinina plasmática¹³⁰.

A consecuencia de su elevada toxicidad y múltiples efectos secundarios, gentamicina sigue teniendo un amplio espectro de utilidad a nivel clínico (AG más utilizado), por lo que en los últimos años, se ha puesto mucho empeño en la búsqueda de nuevos protectores renales de muy distinta naturaleza en estudios *in vitro* e *in vivo* que permitan la utilización de este fármaco. Para prevenir la nefrotoxicidad por gentamicina, se han descrito numerosas estrategias que implican evitar la coadministración simultánea de otros nefrotóxicos, reducir las dosis de gentamicina, sustituirlo por otros antibióticos menos tóxicos pero también menos eficaces o aumentar el consumo de líquidos para disminuir la concentración de gentamicina en la luz tubular¹⁰⁶. Históricamente, muchos autores han trabajado en la búsqueda de nuevos protectores a nivel del túbulo proximal (donde se concentra gentamicina), muchos de los cuales han resultado ser eficaces^{158,178,180}. Autores como Kang C *et al* en 2013, han basado sus estudios en el uso de *Houttuynia cordata* Thunb., un extracto de planta natural y sintético, usado como agente antioxidante para la disminución de la nefrotoxicidad inducida por gentamicina en un modelo en rata, observándose una disminución del efecto nefrotóxico de la misma cuando ésta era coadministrada con el extracto⁷⁶. Negrette-Guzmán M. *et al* en ese mismo año, llevaron a cabo sus estudios de nefroprotección usando sulforafeno (SFN), un isocianato natural localizado en la región de Cruciferae¹¹⁰. Estos autores demostraron tanto a nivel *in vitro* como *in vivo* el efecto protector de SFN contra el FRA inducido por gentamicina al preservar la función mitocondrial y por tanto prevenir la apoptosis por vía intrínseca.

Una de las principales estrategias actuales en la búsqueda de un buen nefroprotector frente a la toxicidad de gentamicina, es intentar reducir la entrada de ésta al interior celular¹⁴³. De hecho, estudios en ratones *knockout* de megalina o de agentes que interfieren a megalina en su proceso de endocitosis, han mostrado que la disminución de esta proteína (responsable del transporte de gentamicina al interior celular) provoca, en consecuencia, una disminución de la entrada del fármaco en las PTEC reduciendo por tanto su nefrotoxicidad¹⁴³. Pero, por un motivo u otro, prácticamente ninguno de estos protectores o estrategias han llegado a ser utilizados en la clínica, ya que o bien no se obtuvieron los resultados deseados o bien no se estudió si dicho protector podría interferir en el efecto bactericida de gentamicina.

Por lo tanto, la investigación en la protección frente al FRA tóxico generado por gentamicina es un campo de máxima actualidad y la búsqueda de nuevas estrategias protectoras para su uso en clínica está en primera línea de referencia a nivel mundial. Los estudios descritos en esta tesis han ido dirigidos precisamente en este ámbito y presentan como novedad, la implicación de cilastatina como agente protector del riñón, que a diferencia de la mayoría de los nefroprotectores descritos hasta la fecha, ya ha sido previamente utilizada en la clínica humana combinada con imipenem en relación 1:1 (desde 1985 como Tienam®) sin presentar ningún tipo de efecto secundario¹¹⁴. La cilastatina es la sal monosódica del ácido (Z)-7-[(2R)-2-amino-3-hidroxi-3-oxopropil]sulfanil-2-[[[(1S)-2,2-dimetilciclopropanocarbonil] amino]hept-2-enoico. Se sintetizó para inhibir de manera competitiva la DHP-I presente en el borde del cepillo de las PTEC para impedir la apertura del anillo β -lactámico del imipenem, aumentando la eficacia terapéutica del mismo e inhibiendo su toxicidad al reducir su captación renal¹²³. De esta manera, el imipenem no metaboliza en su forma inactiva y no se absorbe al interior de la celular tubular, aumentando su concentración en la orina, donde lleva a cabo toda su actividad bactericida^{13,25}.

En los últimos años, nuestro laboratorio ha mostrado evidencias suficientes de la posible utilidad de cilastatina como agente nefroprotector frente a diversos fármacos tóxicos^{17,65,87,88,123} llevándonos a plantear su utilización en ensayos clínicos futuros. Las primeras evidencias que insinuaban un posible papel protector de cilastatina datan de los años 80, en los que se produjo una amplia investigación sobre el nuevo fármaco CsA analizando su interacción con otros fármacos, siendo uno de ellos I/C. Dichos estudios se llevaron a cabo a nivel preclínico^{56,150} y clínico^{54,123,162}, mostrando como esta

combinación era capaz de reducir la toxicidad renal asociada a CsA tras un trasplante renal, cardíaco o de otros órganos. En nuestro laboratorio se demostró por primera vez que cilastatina actuaba directamente sobre las PTEC reduciendo la toxicidad y la apoptosis por CsA y tacrolimus¹²³. Un metaanálisis realizado también en nuestro grupo con todos los datos disponibles de las interacciones de CsA con cilastatina o I/C tanto a nivel clínico como preclínico^{11,19,20,54,56,99,150} mostró que I/C reducía un 43% los niveles de creatinina en suero y un 76% el riesgo de FRA causado por CsA¹⁶². Actualmente, desde 2010 el grupo ha demostrado claramente tanto a nivel *in vitro*¹⁷ como *in vivo*⁶⁵, como cilastatina reduce el daño de las PTEC inducido por cisplatino, con grandes implicaciones futuras para los pacientes oncológicos, que muchas veces tienen que detener su tratamiento por el daño renal asociado no completando sus ciclos o administrándoles fármacos menos nefrotóxicos pero también menos eficaces^{17,65}.

2.- Apoptosis, necrosis y daño renal. Efecto de cilastatina

La muerte celular por gentamicina es un proceso que ha sido previamente estudiado en muchas ocasiones^{53,63,64,89,110}. Los estudios llevados a cabo durante la realización de esta tesis en cultivos primarios de PTEC tras el tratamiento con gentamicina mostraron cambios morfológicos y funcionales de muerte celular tiempo y dosis-dependiente coincidiendo plenamente con estudios paralelos llevados a cabo por otros autores^{42,63,64,108}. Se observó que la vía de muerte celular principal era la apoptosis, si bien existía un porcentaje (10-20%) de muerte por necrosis a tiempos de exposición de gentamicina de 24h (Figura 21). Por ello, la mayor parte de nuestros experimentos de protección fueron realizados a este tiempo, ya que a 48h la muerte celular en las PTEC básicamente ocurría por necrosis (Figura 21). Otros autores coinciden con estos hallazgos^{7,96,131}. Tras el tratamiento a dosis crecientes de gentamicina, las células presentan una morfología redondeada, con mucha refringencia, y se desprenden de la placa de cultivo como se demuestra en la cuantificación de células en el sobrenadante por citometría de flujo. Los ensayos de viabilidad y capacidad de regeneración celular llevados a cabo mediante la técnica del violeta cristal y el aumento de la liberación de nucleosomas al sobrenadante confirmaron plenamente estas observaciones, correspondiéndose estos resultados a las observaciones y trabajos previos descritos por otros autores^{33,131,147,169}.

Estos resultados fueron ampliados y completados mediante la realización de un modelo animal de FRA inducido por gentamicina para estudiar los mediadores implicados en la muerte celular. El tratamiento i.p. de gentamicina 80 mg/kg día durante 8 días, supuso en los animales una pérdida de peso debido a la incapacidad de la nefrona distal de reabsorber agua provocando poliuria y deshidratación. El análisis bioquímico mostró una elevada disfunción renal. Hubo evidencias de cambios a nivel histológico produciéndose depósitos proteicos en la luz tubular a nivel cortical y medular, así como una disminución del aclaramiento de creatinina y de la TFG y un aumento de los niveles de creatinina sérica, NUS, excreción fraccional de sodio, volumen de orina y proteinuria describiendo perfectamente el FRA inducido por gentamicina y coincidiendo plenamente con lo encontrado por otros autores que utilizaron el mismo o similares modelos de FRA generado por gentamicina^{68,69,76,129}. El daño masivo a nivel del túbulo proximal y la ausencia de cambios significativos en la morfología glomerular llevan a pensar que la proteinuria, pese a estar constituida por albúmina y globulinas y ser por tanto de origen glomerular, puede depender de la capacidad de reabsorción proteica del túbulo proximal. Uno de los principales biomarcadores de daño renal más utilizados actualmente, KIM-1, tuvo un aumento masivo en su expresión medido tanto en inmunohistoquímica como por western blot en los animales que recibieron gentamicina, corroborando de esta manera, junto a datos bioquímicos y morfológicos, la correcta generación del FRA por gentamicina.

Posteriormente se realizaron estudios para demostrar la implicación de mediadores apoptóticos de la vía intrínseca ya que estudios previos subrayaban que la apoptosis inducida por gentamicina únicamente se producía vía intrínseca^{22,35,96} y no vía extrínseca³⁵. Se observó un aumento significativo de Bax, caspasa-3 y caspasa-9 activas y ratio Bax/Bcl-2 tras el tratamiento con gentamicina. El daño renal también dio lugar a la fragmentación del ADN. Para corroborar que efectivamente gentamicina no estaba induciendo apoptosis por la vía extrínseca como mostraban los estudios obtenidos por estos autores, realizamos experimentos que nos permitieran ver si caspasa-8 se activaba en presencia de gentamicina, y de modo similar a lo ya publicado, no encontramos diferencias entre grupos. Sin embargo, al estudiar el efecto de gentamicina sobre la síntesis proteica de elementos fundamentales de la ruta extrínseca como son Fas y Fas-L¹⁶⁶, nuestros resultados mostraron un incremento de la expresión de la forma nativa y la glicosidada de Fas, así como un aumento significativo de Fas-L con respecto a los controles, que no cuadraba a priori con los resultados obtenidos en la medida de caspasa-8 activa, en la que no se encontraron diferencias. Justo *et al* obtuvieron

resultados parecidos al analizar la muerte celular en las PTEC por CsA, donde es conocido que mata a las células por vía intrínseca y no vía extrínseca/caspasa-8. En su estudio observaron un incremento claro en la expresión de Fas tanto *in vitro* como *in vivo*, pero no de caspasa-8, que es exactamente el mismo que hemos encontrado en nuestro estudio. El aumento en la expresión de Fas y Fas-L (pero no de caspasa-8) se explica como un epifenómeno que aparece, pero que no participa en el proceso de apoptosis^{71,146}.

Para prevenir la nefrotoxicidad inducida por gentamicina, claramente demostrada a nivel celular como animal en los modelos expuestos para la realización de esta tesis, se empleó cilastatina como agente protector. La característica principal que debe tener todo buen agente nefroprotector es proteger del daño renal, sin dañar a su vez al riñón. Además, éste no debe interferir en la función terapéutica del nefrotóxico en cuestión. Estudios previos de nuestro laboratorio demostraron que cilastatina no ejercía ningún efecto sobre la dinámica de crecimiento de las células del túbulo proximal¹²³. Dichos estudios fueron corroborados asimismo durante la tesis a nivel *in vitro* e *in vivo* mediante la inclusión de un grupo control + cilastatina que siempre ha demostrado la inocuidad del protector en todas las circunstancias y experimentos llevados a cabo a ambos niveles. Por otro lado, como ya se ha comentado, nuestros datos vienen apoyados por el hecho de que el antibiótico I/C lleva utilizándose en la clínica humana durante casi 30 años, no habiendo habido hasta ahora ningún problema asociado a su uso¹⁷¹. La concentración de cilastatina empleada en el modelo celular *in vitro* fue de 200 µg/mL ya que era una dosis cercana a los niveles plasmáticos encontrados en pacientes tratados con I/C¹²³, por lo que nos parecía más clínicamente aceptable. Todos los resultados obtenidos en cultivos demostraron que cilastatina era capaz de reducir parcialmente la muerte celular inducida por gentamicina, recuperando la viabilidad y capacidad regenerativa/proliferativa de las células reduciendo de manera significativa la entrada de gentamicina al interior celular. Pese a que se muestran evidencias de la protección de cilastatina frente a la apoptosis, ensayos de la liberación de LDH demostraron que cilastatina no era capaz de proteger de la necrosis, independientemente de la duración del tratamiento siendo por lo tanto un protector específico frente a la muerte celular por apoptosis.

En referencia a la dosis empleada de cilastatina en el modelo animal, nuestro laboratorio tenía experiencia previa en estudios de nefroprotección llevados a cabo por la toxicidad renal de cisplatino, por lo que utilizamos las mismas dosis, dado los buenos

resultados que obtuvimos⁶⁵. A nivel *in vivo*, cilastatina fue capaz de recuperar la disfunción renal inducida por gentamicina recuperando parcial o totalmente los valores de los parámetros bioquímicos de función renal encontrados en los controles. Los estudios histológicos mostraron una clara disminución de daño renal en presencia de cilastatina, desapareciendo en su totalidad los acúmulos proteicos tanto a nivel medular como cortical (Figuras 27 y 28). El biomarcador KIM-1 fue prácticamente eliminado en presencia de cilastatina. Asimismo, cilastatina impidió la activación de caspasa-9 y caspasa-3 activas, y disminuyó el ratio Bax/Bcl-2 hasta niveles prácticamente normales, reduciendo de modo muy significativo la apoptosis generada por la vía intrínseca. Cilastatina no ejerció ningún efecto a nivel de activación de la caspasa-8, manteniéndose en los mismos niveles que el resto de grupos, aunque si fue capaz de disminuir los niveles previamente aumentados de Fas y Fas-L. Todo esto en su conjunto permitió una disminución en la activación de nucleasas en el núcleo disminuyendo el porcentaje de células con ADN fragmentado.

3.- Estrés oxidativo. Efecto de cilastatina

Las ROS se forman por la reducción incompleta del oxígeno celular dando lugar a la formación de O_2^- , H_2O_2 , OH^\cdot , 1O_2 y $ONOO^\cdot$ que juegan un papel esencial en los mecanismos de enfermedades como el FRA. Una gran parte de la toxicidad renal generada por gentamicina se debe a la generación de ROS como consecuencia de una pérdida del equilibrio redox celular y que está íntimamente relacionado con los procesos inflamatorios y muerte celular^{43,76,121}. El EO inducido por gentamicina tiene lugar como consecuencia de un desequilibrio entre ROS y la pérdida de funcionalidad de los sistemas antioxidantes celulares que impiden detoxificar los reactivos intermedios o reparar el daño resultante. En nuestros resultados hemos podido observar una disminución significativa de los sistemas antioxidantes en la orina en presencia de gentamicina que posteriormente se restauró gracias al efecto nefroprotector de cilastatina. Estos sistemas antioxidantes vienen regulados por la actuación de una serie de enzimas implicadas en procesos como la reducción del anión superóxido a O_2^- y H_2O_2 , catalizada por las SODs, principalmente por la enzima Cu/Zn SOD que contribuye en torno al 80%; por lo que elevadas concentraciones de enzima permiten la disminución de la presencia de ROS⁷⁶. El H_2O_2 obtenido es a su vez reducido a H_2O y O_2 a través de la catalasa y peroxidasa. Igualmente, niveles elevados de estas enzimas, aumentan la

capacidad antioxidante de los diferentes tejidos. Además, se ha demostrado que gentamicina aumenta los niveles de producción de H_2O_2 a través de la mitocondria en un proceso dosis-dependiente¹⁷² coincidiendo plenamente con la disminución de los sistemas antioxidantes obtenidos en nuestro modelo. La principal causa de este aumento puede ser que las enzimas respiratorias mitocondriales son dianas potenciales de gentamicina, por lo que en su presencia, su concentración y actividad disminuyen a medida que aumenta el daño renal¹⁰⁰. Como consecuencia se produce un efecto inhibitorio sobre las actividades de las enzimas antioxidantes catalasa, glutation-peroxidasa y Cu/Zn SOD^{117,122} y un aumento de peroxidación lipídica a nivel de la membrana plasmática aumentando los niveles de concentración de numerosos metabolitos secundarios que se desprenden al citoplasma. Esto es justo lo que nosotros hemos encontrado al tratar con gentamicina, disminución de la concentración de Cu/Zn SOD y catalasa así como un aumento de la formación de 4-HNE (marcador de peroxidación lipídica). Cilastatina redujo el daño generado por el EO llevando los valores de expresión de estas proteínas a valores cercanos a los alcanzados por los animales control.

Por último, se estudió el efecto de determinadas proteínas de choque térmico (HSPs) ya que muchos estudios mencionan su importancia en la protección celular frente a gentamicina al unirse específicamente al antibiótico^{102,176} correlacionando sus expresiones con el descenso de daño a nivel oxidativo en el túbulo proximal⁵⁰. Son proteínas altamente conservadas que se expresan rápidamente en respuesta al EO. Las chaperonas, un tipo de HSPs, que han sido estudiadas durante esta tesis (HSP-27 y HSP-70) son necesarias para el correcto plegamiento de proteínas e inducidas en las células epiteliales del riñón en presencia de gentamicina¹⁷⁶. Como era de esperar, HSP-27, localizada principalmente en el citosol aunque también en la región perinuclear, RE y núcleo, mostró un aumento de expresión en respuesta al EO. Sin embargo, HSP-70 tuvo el efecto contrario, gentamicina inhibió su actividad posiblemente a consecuencia de la inducción de un cambio conformacional en su estructura aunque sin saber si éste afectó a su capacidad de asistir al plegamiento de proteínas como desvelan autores previos¹⁷⁶. La coadministración de cilastatina, de manera similar al resto de resultados, restauró los niveles de ambas proteínas hasta los valores normales encontrados en los animales control.

En conclusión, todos nuestros estudios sobre el daño renal que gentamicina produce a consecuencia de la inducción de EO fueron eficazmente reparados por la acción inhibitoria que cilastatina ejerce sobre el antibiótico. Resultados similares fueron obtenidos gracias al uso de agentes antioxidantes como *Houttuynia cordata* Thunb⁷⁶ y SFN¹¹⁰ que también disminuyeron el EO, aumentando la activación de enzimas antioxidantes.

4.- Inflamación y fibrosis. Efecto de cilastatina

Muchos trabajos publicados mencionan la implicación directa de la inflamación en la nefrotoxicidad inducida por gentamicina^{74,157}. Con la finalidad de comprobar si cilastatina inhibía la aparición de inflamación tras el tratamiento con el antibiótico, se estudió el comportamiento de distintas proteínas (citoquinas pro-inflamatorias) que aparecen en procesos inflamatorios como TNF α , el infiltrado de monocitos/macrófagos, la proteína quimioatrayente de monocitos MCP-1 o la molécula de adhesión celular expresada durante los procesos inflamatorios VCAM-1. En todas ellas, gentamicina promovió un aumento de síntesis en respuesta al proceso inflamatorio a nivel sistémico u orgánico. Por otro lado, se observó capacidad inhibitoria de cilastatina indicando que también actuaba como agente anti-inflamatorio en procesos de toxicidad renal. Además se analizó la presencia de fibrosis mediante la determinación de fibras de colágeno y la concentración de citoquinas como TGF β y el factor pro-fibrótico CTGF. Estudios previos ya habían demostrado un aumento de TGF β y CTGF como consecuencia del tratamiento con gentamicina⁵¹. De igual manera, en nuestros experimentos, la administración de gentamicina promovió un aumento de expresión tanto de TGF β como de CTGF que cilastatina fue capaz de reducir hasta niveles próximos a los encontrados en los animales controles. Sin embargo, la determinación de la presencia de fibrosis en el tejido renal desveló que no había cambios significativos entre grupos, posiblemente a consecuencia de que el tiempo de tratamiento con gentamicina no fue lo suficientemente prolongado para generar en los animales un proceso inflamatorio crónico y por tanto, detectable. Sin embargo, el hecho de que los niveles de TGF β y CTGF estén sobre-expresados en presencia de gentamicina, nos hace pensar que el fármaco producirá fibrosis a tiempos más largos y que cilastatina podría ser capaz de revertir el proceso.

5.- Expresión génica. Efecto de cilastatina

Finalmente y tras comprobar que cilastatina era un muy buen agente protector en la toxicidad renal generada por gentamicina a nivel proteico, se quiso comprobar si también era capaz de inducir cambios a nivel transcripcional. Se realizaron estudios sobre la expresión génica de muchos mediadores involucrados en los procesos de daño anteriormente descritos, obteniendo resultados distintos. Si bien la expresión de genes como el receptor de muerte Fas y Fas-L; el transportador de gentamicina, megalina; el marcador de daño renal KIM-1 o la citoquina TNF α se vieron claramente modificadas en los animales tratados con gentamicina, la coadministración con cilastatina no indujo ningún efecto en la expresión génica manteniéndose en los niveles similares a los encontrados en el grupo gentamicina. Resultados similares en Fas, Fas-L y TNF α fueron encontrados previamente en nuestro laboratorio al estudiar la protección renal de cilastatina en el daño nefrotóxico inducido por cisplatino *in vitro*¹⁷. Sin embargo otros genes como MCP-1, TGF β y las interleuquinas IL-1 β e IL-6 vieron aumentadas sus niveles en presencia de gentamicina como era de esperar, pero cilastatina en estos casos, fue capaz de reducir parcial y significativamente sus valores con respecto a los animales del grupo gentamicina. La conclusión a la que llegamos tras analizar los resultados, es que cilastatina no ejerce ningún efecto a nivel transcripcional. El hecho de que los niveles génicos de las citoquinas estén disminuidos en presencia de cilastatina puede deberse a que ésta protegió o disminuyeron los valores previamente aumentados por gentamicina de ciertas proteínas implicadas precisamente en la transcripción de otras proteínas, como serían las citoquinas pro-inflamatorias. Un ejemplo de estas proteínas lo podría representar NF κ B, responsable principal de la expresión subsiguiente de citoquinas en la respuesta inmune¹⁴². Si bien en esta tesis no hemos medido la posible protección ejercida por cilastatina sobre los niveles de expresión de NF κ B que previamente ha sido demostrado que aumentan como consecuencia del tratamiento con gentamicina^{137,161}, resultados previos del laboratorio con el tóxico cisplatino, hacen pensar que cilastatina recuperaría sus niveles de expresión hasta valores cercanos a los encontrados en los controles¹⁷. Por tanto, si se redujera la expresión proteica de NF κ B en presencia de cilastatina, la formación de las proteínas dependientes del factor nuclear o de otros posibles factores inductores de genes, sería menor y por consiguiente, la expresión génica resultante también estaría disminuida en relación a la de los animales que únicamente fueron tratados con gentamicina.

6.- Efecto de cilastatina sobre el transporte celular de gentamicina. ¿Mecanismo de protección?

En los estudios de daño renal en el túbulo proximal por gentamicina y de protección por cilastatina llevados a cabo, observamos que la concentración intracelular de fármaco disminuye en torno al 25-30% en presencia de cilastatina. Estudios previos también realizados en nuestro laboratorio con otros fármacos nefrotóxicos como cisplatino, CsA o tacrolimus mostraron hallazgos parecidos^{17,65,123} y por ello, nuestra hipótesis ha consistido en que la protección era consecuencia de un efecto ejercido únicamente en las BDC localizadas en el borde en cepillo de las PTEC al llevarse a cabo la interacción de cilastatina con la DHP-I justo en esa región¹²³. Hemos comprobado que dicha unión provoca un cambio en la fluidez de membrana¹²³, pero también podría inducir un reordenamiento estructural en la misma o un impedimento estérico que podría afectar a determinados procesos a nivel de los *lipid rafts* y que llevaría a proteger a las células tubulares. Esta hipótesis viene apoyada por varios resultados obtenidos previamente en el laboratorio. Los estudios previos de protección con cilastatina frente al FRA inducido por cisplatino, mostraban que la protección que ejercía cilastatina era debida a la interferencia en la internalización del complejo Fas/Fas-L. El receptor Fas se encuentra situado en las BDC¹⁷, y es allí donde se une su ligando, trimerizan y se internalizan para activar la vía extrínseca de la apoptosis¹⁷. Los estudios mediante microscopía confocal mostraron que en ausencia de cilastatina, el complejo Fas/Fas-L (Figura 59) se introduce al interior celular en su mayor parte especialmente tras un tiempo de 2 horas. El bloqueo que ejerce cilastatina al unirse a DHP-I en las BDC, puede deberse a que estéricamente impide el acoplamiento de estos ligandos a sus correspondientes receptores de membrana o que al provocar el cambio en la fluidez de membrana, haga que el *lipid raft* no se internalice y por tanto el complejo Fas/Fas-L no se internalice apareciendo toda la tinción en la membrana (Figura 59).

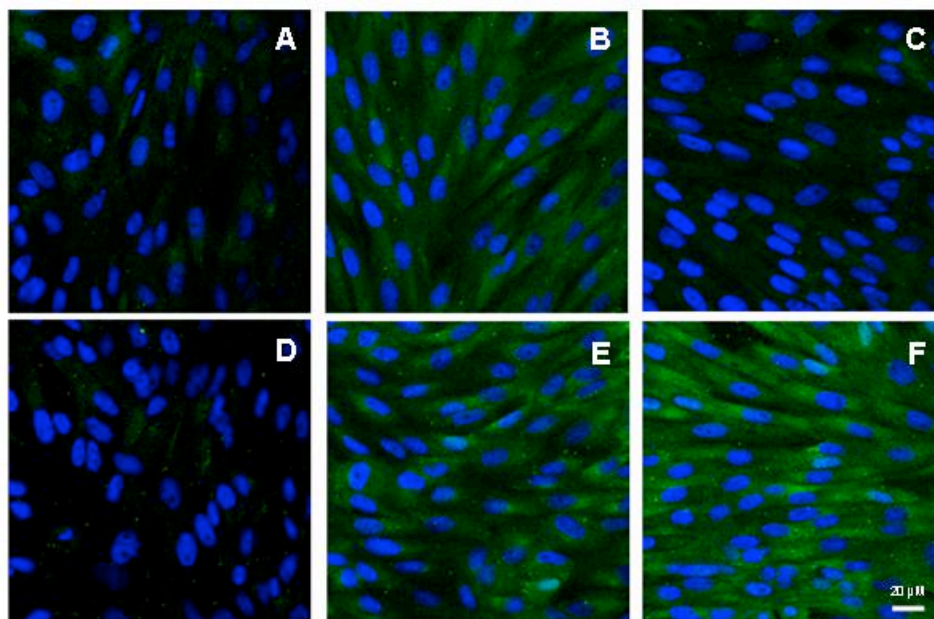


FIGURA 59. Efecto de cilastatina y cisplatino sobre la internalización de Fas-L en células tubulares proximales. Imágenes representativas de 3 inmunolocalizaciones independientes de Fas-L tras el tratamiento con cisplatino 30 μ M durante 0, 0.5 y 2 horas (A, B y C) o cisplatino + cilastatina 200 μ g/mL a los mismos tiempos (D, E y F). El tratamiento con cisplatino muestra presencia de Fas-L en la membrana tras 0.5 horas y desaparición del mismo al cabo de 2 horas. La coadministración de cilastatina impide la internalización de Fas-L tras 2 horas de tratamiento. Las imágenes fueron adquiridas por microscopía confocal.

De la misma forma, otro ejemplo estudiado en el laboratorio es la entrada al interior celular de la toxina B colérica, cuyo receptor, el monosialosil-gangliósido se encuentra también situado en los *lipid rafts* o BDC de las PTEC. De igual manera que el complejo Fas/Fas-L, al incubar las PTEC con toxina B colérica fluorescente en presencia de cilastatina, no se internaliza como puede observarse en la Figura 60 quedando la tinción en la membrana, mientras que en aquellas PTEC que no tuvieron cilastatina, la tinción se encuentra claramente en el interior celular, muy probablemente en el aparato de Golgi⁸⁸.

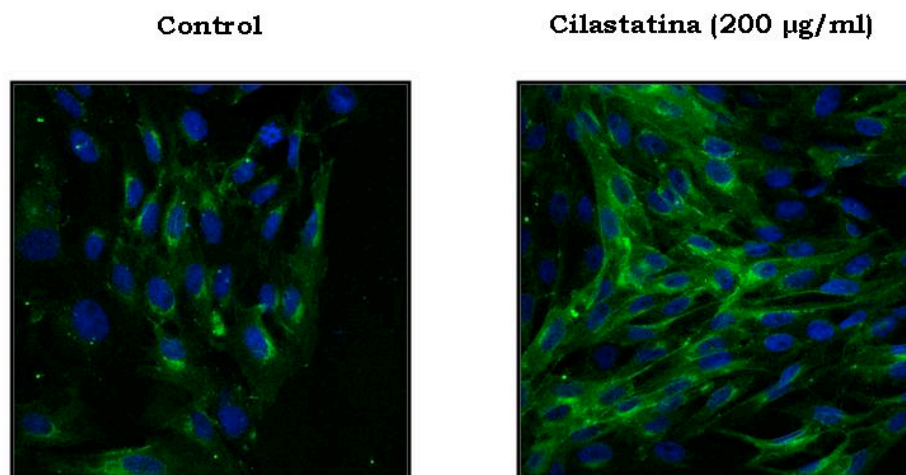


FIGURA 60. Efecto de cilastatina sobre la internalización de toxina B colérica a través de las balsas de colesterol en células tubulares proximales (PTEC). Imágenes representativas de inmunolocalizaciones por microscopía confocal de toxina B colérica-FITC en PTEC en presencia/ausencia de cilastatina 200µg/mL durante 2.5 horas. Se observa un cambio en la distribución de toxina B, siendo perinuclear en el control debido a su internalización a través de las balsas de colesterol. El tratamiento con cilastatina impide dicha internalización, permaneciendo la toxina B en la membrana celular.

Con todos estos datos, hay que comentar ahora que el receptor endocítico por el que mayoritariamente gentamicina entra en la célula, megalina, también se encuentra en las BDC o *lipid rafts* de las PTEC²³. Por lo tanto, de la misma manera que ocurriera para el caso de la toxina B colérica y del complejo Fas/Fas-L, al unirse cilastatina a DHP-I, debe de haber un cambio conformacional que provocaría un impedimento en el acoplamiento de gentamicina a su receptor megalina, o bien un impedimento en la internalización de los mismos. Al no producirse dicha unión o entrada, y dado que gentamicina es un antibiótico que difícilmente es capaz de atravesar por sí mismo las membranas biológicas, se reduciría su concentración intracelular (como ya hemos demostrado) y se produciría una notable disminución de su presencia en los lisosomas y menor fosfolipidosis, que conllevaría a una menor activación de enzimas proteolíticas como las catepsinas resultando en una menor activación de Bid, responsable a su vez de la activación de la vía intrínseca de la apoptosis y en última instancia, una menor muerte celular.

A nivel génico, megalina disminuye su expresión en relación con los controles tras el tratamiento con gentamicina. Esto puede deberse a que por algún motivo, megalina no consigue reciclarse, quedando acumulada en el interior de la célula y disminuyendo su expresión a nivel transcripcional.

No obstante, la protección que ofrece cilastatina no es del 100%, ya que la internalización de gentamicina también puede producirse por otras vías secundarias como son la propia acumulación del fármaco en la membrana, la presencia de receptores sensibles a Ca^{2+} extracelular o la presencia de un canal catiónico inespecífico denominado canal del receptor transitorio vaniloide tipo 4 expresado en el túbulo distal¹²⁷ o la presencia de megalina en otras estructuras diferentes a las BDC de las PTEC^{23,127}.

7.- Cilastatina: un gran candidato para el tratamiento en la nefrotoxicidad por gentamicina

Habiendo ya por tanto demostrado que cilastatina protege del FRA inducido por gentamicina, el otro aspecto más importante para poder considerar a cilastatina como un candidato terapéutico prometedor en el daño renal inducido por gentamicina, era demostrar que este protector no interfería en la capacidad bactericida del antibiótico. Los estudios llevados a cabo sobre distintas cepas de dos bacterias sensibles a gentamicina, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* mostraron que cilastatina no influenciaba en el valor de la CMB (mínima concentración de gentamicina capaz de matar al 99.9% de las bacterias), y por tanto, interfería únicamente en el daño tóxico renal que este antibiótico es capaz de producir.

Pese a las evidencias mostradas durante esta tesis y en trabajos previos, cilastatina, aun presentando un potencial elevado como nefroprotector, presenta una serie de carencias que sería necesario solventar antes de llevar a cabo su posible comercialización. La más importante de todas ellas es que presenta una baja disponibilidad oral, en torno al 8%, ya que posiblemente se esté uniendo a la enzima DHP-I localizada en el borde en cepillo de las células del epitelio intestinal limitando su administración a la vía parental o i.v.

Con los resultados obtenidos podemos concluir que existen evidencias suficientes que demuestran la acción nefroprotectora de cilastatina tanto *in vitro* como *in vivo* en la toxicidad generada por el tratamiento con gentamicina, interfiriendo en la entrada del fármaco, que da lugar a una reducción de la activación de las principales rutas de muerte celular y de daño oxidativo e inflamatorio como resultado del bloqueo de los *lipid rafts*,

reduciendo la internalización del fármaco nefrotóxico al interior celular. El hecho de que cilastatina pueda ser conjuntamente administrado con gentamicina, principal antibiótico para tratar enfermedades causadas por bacterias Gram negativas, sin que altere su funcionalidad, convierten a cilastatina en una potencial estrategia terapéutica de futuro para la preservación de la función renal en pacientes con enfermedades oculares u otras enfermedades como la peritonitis, meningitis, neumonía estafilocócica, otitis, septicemia y otras muchas que requieren el uso de este antibiótico y que podrían desembocar en una disfunción renal seria.

VIII.- CONCLUSIONES

1. Gentamicina produce daño renal en las células proximales tubulares renales en cultivo (caracterizado por redondeamiento celular y desprendimiento al sobrenadante) y en el modelo animal de toxicidad aguda (caracterizado por un aumento de creatinina, NUS, proteinuria y de lesiones tubulointersticiales). La aparición del daño está relacionado con la activación de la vía intrínseca de la apoptosis, y la aparición de estrés oxidativo, inflamación y fibrosis.
2. Cilastatina por si sola no induce ningún cambio sobre la dinámica de crecimiento de las células del túbulo proximal en cultivo, morfología, porcentaje de supervivencia y enriquecimiento nucleosomal. Además no presenta efectos en los pesos de los animales, función y morfología renal o en la expresión de mediadores en las vías apoptóticas, de estrés o inflamación.
3. El cotratamiento de cilastatina con gentamicina inhibe la aparición de manera parcial o total de muerte celular tanto a nivel *in vitro* como *in vivo* así como el daño oxidativo, inflamación y fibrosis en el modelo *in vivo* de fracaso renal agudo.
4. La acción nefroprotectora de cilastatina se debe a su unión con la enzima DHP-I localizada en los *lipid rafts* del borde en cepillo de las células proximales tubulares.
5. Cilastatina inhibe parcialmente la entrada y acumulación de gentamicina tanto en las células del túbulo proximal en cultivo como en el tejido renal de los animales, debido a la interferencia realizada a nivel de balsas de colesterol con su principal receptor, megalina.
6. Cilastatina no es capaz de inhibir la muerte bacteriana producida por gentamicina probada sobre diferentes cepas de *Staphylococcus Aureus* y *Escherichia Coli*. Por lo tanto, cilastatina ejerce su función protectora a nivel renal de manera órgano-específica sin afectar al efecto farmacológico antibacteriano de la gentamicina.

En definitiva, esta tesis pretende probar que cilastatina es una importante alternativa terapéutica ante las complicaciones renales producidos en pacientes con diversas infecciones bacterianas (peritonitis, neumonías, septicemia bacteriana, etc) tratados con gentamicina ya que ha demostrado ser altamente efectiva como protector renal sin comprometer su poder antibacteriano.

IX.- BIBLIOGRAFÍA

1. Adachi H, Katayama T, Inuzuka C, Oikawa S, Tsujimoto M, Nakazato H. Identification of membrane anchoring site of human renal dipeptidase and construction and expression of a cDNA for its secretory form. *J Biol Chem* 1990; **265**(25): 15341-5.
2. Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 1998; **281**(5381): 1322-6.
3. Adams JM, Cory S. Bcl-2-regulated apoptosis: mechanism and therapeutic potential. *Curr Opin Immunol* 2007; **19**(5): 488-96.
4. Adler S, Huang H. Oxidant stress in kidneys of spontaneously hypertensive rats involves both oxidase overexpression and loss of extracellular superoxide dismutase. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004; **287**(5): F907-13.
5. Akcay A, Nguyen Q, Edelstein CL. Mediators of inflammation in acute kidney injury. *Mediators Inflamm* 2009; **2009**: 137072.
6. Algeciras-Schimmich A, Shen L, Barnhart BC, Murmann AE, Burkhardt JK, Peter ME. Molecular ordering of the initial signaling events of CD95. *Mol Cell Biol* 2002; **22**(1): 207-20.
7. Ali BH. Agents ameliorating or augmenting experimental gentamicin nephrotoxicity: some recent research. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* 2003; **41**(11): 1447-52.
8. Andrews MJ. Determination of minimum inhibitory concentration. *J Antimicrob Chemother* 2001; **28 (Suppl 31)**: 5-16.
9. Anzai N, Endou, H. Renal drug transporters and nephrotoxicity. *Proc 6th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Science AATEX* 2011; **14**(Conference Proceeding): 447-52.
10. Baghaie A, B. M. A. C. The effect of imipenem/cilastatin on acute cyclosporine nephrotoxicity in heart/lung transplant patients. *Crit Care Med* 1995; **23**(A241)(Abstract).
11. Baghaie AA, Mojtahedzadeh M, Levine RL, Fromm RE, Jr., Guntupalli KK, Opekun AR, Jr. Comparison of the effect of intermittent administration and continuous infusion of famotidine on gastric pH in critically ill patients: results of a prospective, randomized, crossover study. *Crit Care Med* 1995; **23**(4): 687-91.
12. Barres BA, Hart IK, Coles HS, et al. Cell death and control of cell survival in the oligodendrocyte lineage. *Cell* 1992; **70**(1): 31-46.
13. Birnbaum J, Kahan FM, Kropp H, MacDonald JS. Carbapenems, a new class of beta-lactam antibiotics. Discovery and development of imipenem/cilastatin. *Am J Med* 1985; **78**(6A): 3-21.
14. Bledsoe G, Crickman S, Mao J, et al. Kallikrein/kinin protects against gentamicin-induced nephrotoxicity by inhibition of inflammation and apoptosis. *Nephrol Dial Transplant* 2006; **21**(3): 624-33.

15. Brown D. Structure and function of membrane rafts. *Int J Med Microbiol* 2002; **291**(6-7): 433-7.
16. Camano-Paez S, Lazaro-Fernandez A, Callejas-Martinez R, Lazaro-Manero JA, Castilla-Barba M, Martin-Vasallo P, Martinez-Escandell A, Tejedor-Jorge A. Study on the role on the tubule in renal vasoconstriction induced by cyclosporin. *Actas Urol Esp* 2008; **32**: 128-39.
17. Camano S, Lazaro A, Moreno-Gordaliza E, et al. Cilastatin attenuates cisplatin-induced proximal tubular cell damage. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 2010; **334**(2): 419-29.
18. Campbell BJ, Di Shih Y, Forrester LJ, Zahler WL. Specificity and inhibition studies of human renal dipeptidase. *Biochim Biophys Acta* 1988; **956**(2): 110-8.
19. Carmellini M, Frosini F, Filipponi F, Boggi U, Mosca F. Effect of cilastatin on cyclosporine-induced acute nephrotoxicity in kidney transplant recipients. *Transplantation* 1997; **64**(1): 164-6.
20. Carmellini M, Matteucci E, Boggi U, Cecconi S, Giampietro O, Mosca F. Imipenem/cilastatin reduces cyclosporin-induced tubular damage in kidney transplant recipients. *Transplant Proc* 1998; **30**(5): 2034-5.
21. Chandrasekar PH, Cronin SM. Nephrotoxicity in bone marrow transplant recipients receiving aminoglycoside plus cyclosporine or aminoglycoside alone. *J Antimicrob Chemother* 1991; **27**(6): 845-9.
22. Chen YC, Chen CH, Hsu YH, et al. Leptin reduces gentamicin-induced apoptosis in rat renal tubular cells via the PI3K-Akt signaling pathway. *European journal of pharmacology* 2011; **658**(2-3): 213-8.
23. Christensen EI, Birn H. Megalin and cubilin: synergistic endocytic receptors in renal proximal tubule. *American journal of physiology Renal physiology* 2001; **280**(4): F562-73.
24. Chwieralski CE, Welte T, Buhling F. Cathepsin-regulated apoptosis. *Apoptosis* 2006; **11**(2): 143-9.
25. Clissold SP, Todd PA, Campoli-Richards DM. Imipenem/cilastatin. A review of its antibacterial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy. *Drugs* 1987; **33**(3): 183-241.
26. Coggins CF, LST. Acute renal failure associated with antibiotics, anesthetic agents and radiographic contrast agents. *Acute renal failure Ed BM Brenner and JM Lazarus, Churchill Livingstone* 1988: pp. 295-352.
27. Cui S, Verroust PJ, Moestrup SK, Christensen EI. Megalin/gp330 mediates uptake of albumin in renal proximal tubule. *The American journal of physiology* 1996; **271**(4 Pt 2): F900-7.
28. Cuzzocrea S, Mazzon E, Dugo L, et al. A role for superoxide in gentamicin-mediated nephropathy in rats. *Eur J Pharmacol* 2002; **450**(1): 67-76.

29. Dagil R, O'Shea C, Nykjaer A, Bonvin AM, Kragelund BB. Gentamicin binds to the megalin receptor as a competitive inhibitor using the common ligand binding motif of complement type repeats: insight from the nmr structure of the 10th complement type repeat domain alone and in complex with gentamicin. *J Biol Chem* 2013; **288**(6): 4424-35.
30. Davis CG, Goldstein JL, Sudhof TC, Anderson RG, Russell DW, Brown MS. Acid-dependent ligand dissociation and recycling of LDL receptor mediated by growth factor homology region. *Nature* 1987; **326**(6115): 760-5.
31. De Broe ME, Paulus, G. J., Verpooten, G. A. et al. Early effects of gentamicin, tobramycin and amikacin on the human kidney. *Kidney Int* 1984; **25**: 643-52.
32. Degterev A, Yuan J. Expansion and evolution of cell death programmes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; **9**(5): 378-90.
33. Denamur S, Van Bambeke F, Mingeot-Leclercq MP, Tulkens PM. Apoptosis induced by aminoglycosides in LLC-PK1 Cells: comparative study of neomycin, gentamicin, amikacin, and isepamicin using electroporation. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2008; **52**(6): 2236-8.
34. Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* 2009; **29**(6): 313-26.
35. Ding D, Jiang H, Salvi RJ. Mechanisms of rapid sensory hair-cell death following co-administration of gentamicin and ethacrynic acid. *Hearing research* 2010; **259**(1-2): 16-23.
36. Dos Santos OF, Boim MA, Barros EJ, Schor N. Role of platelet activating factor in gentamicin and cisplatin nephrotoxicity. *Kidney Int* 1991; **40**(4): 742-7.
37. Drusano GL, Standiford HC, Bustamante CI, et al. Safety and tolerability of multiple doses of imipenem/cilastatin. *Clinical pharmacology and therapeutics* 1985; **37**(5): 539-43.
38. Edson RS, Terrell CL. The aminoglycosides. *Mayo Clin Proc* 1999; **74**(5): 519-28.
39. Edwards CQ, Smith CR, Baughman KL, Rogers JF, Lietman PS. Concentrations of gentamicin and amikacin in human kidneys. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 1976; **9**(6): 925-7.
40. Edwards JR, Diamantakos EA, Peuler JD, Lamar PC, Prozialeck WC. A novel method for the evaluation of proximal tubule epithelial cellular necrosis in the intact rat kidney using ethidium homodimer. *BMC Physiol* 2007; **7**: 1.
41. Eiger IZ, Greenstein JP. Addition products of dehydropeptides. *Arch Biochem* 1948; **19**(3): 467-73.
42. El Mouedden M, Laurent G, Mingeot-Leclercq MP, Tulkens PM. Gentamicin-induced apoptosis in renal cell lines and embryonic rat fibroblasts. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 2000; **56**(1): 229-39.

43. El-Tantawy WH, Mohamed SA, Abd Al Haleem EN. Evaluation of biochemical effects of *Casuarina equisetifolia* extract on gentamicin-induced nephrotoxicity and oxidative stress in rats. Phytochemical analysis. *Journal of clinical biochemistry and nutrition* 2013; **53**(3): 158-65.
44. Enomoto A, Takeda M, Tojo A, et al. Role of organic anion transporters in the tubular transport of indoxyl sulfate and the induction of its nephrotoxicity. *J Am Soc Nephrol* 2002; **13**(7): 1711-20.
45. Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL, Henson PM. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol* 1992; **148**(7): 2207-16.
46. Ferguson MA, Masterson WJ, Homans SW, McConville MJ. Evolutionary aspects of GPI metabolism in kinetoplastid parasites. *Cell Biol Int Rep* 1991; **15**(11): 991-1005.
47. Ford DM, Dahl RH, Lamp CA, Molitoris BA. Apically and basolaterally internalized aminoglycosides colocalize in LLC-PK1 lysosomes and alter cell function. *Am J Physiol* 1994; **266**(1 Pt 1): C52-7.
48. Frey N, Olson EN. Cardiac hypertrophy: the good, the bad, and the ugly. *Annu Rev Physiol* 2003; **65**: 45-79.
49. Frommer JP, Senekjian HO, Babino H, Weinman EJ. Intratubular microinjection study of gentamicin transport in the rat. *Mineral and electrolyte metabolism* 1983; **9**(2): 108-12.
50. Garrido C. Size matters: of the small HSP27 and its large oligomers. *Cell death and differentiation* 2002; **9**(5): 483-5.
51. Geleilate TJ, Melo GC, Costa RS, Volpini RA, Soares TJ, Coimbra TM. Role of myofibroblasts, macrophages, transforming growth factor-beta, endothelin, angiotensin-II, and fibronectin in the progression of tubulointerstitial nephritis induced by gentamicin. *Journal of nephrology* 2002; **15**(6): 633-42.
52. Golstein P, Kroemer G. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends Biochem Sci* 2007; **32**(1): 37-43.
53. Gong X, Celsi G, Carlsson K, Norgren S. Protective effects of N-acetylcysteine amide (NACA) on gentamicin-induced apoptosis in LLC-PK1 cells. *Ren Fail* 2012; **34**(4): 487-94.
54. Gruss E, Tomas JF, Bernis C, Rodriguez F, Traver JA, Fernandez-Ranada JM. Nephroprotective effect of cilastatin in allogeneic bone marrow transplantation. Results from a retrospective analysis. *Bone marrow transplantation* 1996; **18**(4): 761-5.
55. Gyure WL. Comparison of several methods for semiquantitative determination of urinary protein. *Clin Chem* 1977; **23**(5): 876-9.
56. Hammer C, Thies JC, Mraz W, Mihatsch M. Reduction of cyclosporin (CSA) nephrotoxicity by imipenem/cilastatin after kidney transplantation in rats. *Transplant Proc* 1989; **21**(1 Pt 1): 931.

57. Heeba GH. Angiotensin II receptor blocker, losartan, ameliorates gentamicin-induced oxidative stress and nephrotoxicity in rats. *Pharmacology* 2011; **87**(3-4): 232-40.
58. Hensley K, Robinson KA, Gabbita SP, Salsman S, Floyd RA. Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury. *Free Radic Biol Med* 2000; **28**(10): 1456-62.
59. Hock R, Anderson RJ. Prevention of drug-induced nephrotoxicity in the intensive care unit. *J Crit Care* 1995; **10**(1): 33-43.
60. Hooper NM. Glycosyl-phosphatidylinositol anchored membrane enzymes. *Clin Chim Acta* 1997; **266**(1): 3-12.
61. Horibe T, Matsui H, Tanaka M, et al. Gentamicin binds to the lectin site of calreticulin and inhibits its chaperone activity. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; **323**(1): 281-7.
62. Howell BW, Herz J. The LDL receptor gene family: signaling functions during development. *Curr Opin Neurobiol* 2001; **11**(1): 74-81.
63. Hsu YH, Chen TH, Wu MY, et al. Protective effects of Zhibai Dihuang Wan on renal tubular cells affected with gentamicin-induced apoptosis. *J Ethnopharmacol* 2014; **151**(1): 635-42.
64. Hsu YH, Chen CH, Hou CC, et al. Prostacyclin protects renal tubular cells from gentamicin-induced apoptosis via a PPARalpha-dependent pathway. *Kidney Int* 2008; **73**(5): 578-87.
65. Humanes B, Lazaro A, Camano S, et al. Cilastatin protects against cisplatin-induced nephrotoxicity without compromising its anticancer efficiency in rats. *Kidney Int* 2012; **82**(6): 652-63.
66. Humes HD, Lake EW, Liu S. Renal tubule cell repair following acute renal injury. *Miner Electrolyte Metab* 1995; **21**(4-5): 353-65.
67. Isenberg DH. Test to assess bactericidal activity. Antimicrobial susceptibility testing clinical microbiology procedures handbook. *ASM, Washington* 1999; **5** (16): 1-14.
68. Jafarey M, Changizi Ashtiyani S, Najafi H. Calcium Dobesilate for Prevention of Gentamicin-induced Nephrotoxicity in Rats. *Iranian journal of kidney diseases* 2014; **8**(1): 46-52.
69. Jia P, Teng J, Zou J, et al. Intermittent exposure to xenon protects against gentamicin-induced nephrotoxicity. *PLoS One* 2013; **8**(5): e64329.
70. Just M, Erdmann G, Habermann E. The renal handling of polybasic drugs. 1. Gentamicin and aprotinin in intact animals. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 1977; **300**(1): 57-66.
71. Justo P, Lorz C, Sanz A, Egido J, Ortiz A. Intracellular mechanisms of cyclosporin A-induced tubular cell apoptosis. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2003; **14**(12): 3072-80.

72. Kacew S, Bergeron MG. Pathogenic factors in aminoglycoside-induced nephrotoxicity. *Toxicol Lett* 1990; **51**(3): 241-59; discussion 37-9.
73. Kahan FM, Rogers JD. Imipenem/cilastatin: evolution of the sustained-release intramuscular formulation. *Chemotherapy* 1991; **37 Suppl 2**: 21-5.
74. Kalayarasan S, Prabhu PN, Sriram N, Manikandan R, Arumugam M, Sudhandiran G. Diallyl sulfide enhances antioxidants and inhibits inflammation through the activation of Nrf2 against gentamicin-induced nephrotoxicity in Wistar rats. *European journal of pharmacology* 2009; **606**(1-3): 162-71.
75. Kaloyanides GJ, Pastoriza-Muñoz, E. Aminoglycoside nephrotoxicity. *Kidney Int* 1980; **18**: 571-82.
76. Kang C, Lee H, Hah DY, et al. Protective Effects of Houttuynia cordata Thunb. on Gentamicin-induced Oxidative Stress and Nephrotoxicity in Rats. *Toxicological research* 2013; **29**(1): 61-7.
77. Keynan S, Hooper NM, Felici A, Amicosante G, Turner AJ. The renal membrane dipeptidase (dehydropeptidase I) inhibitor, cilastatin, inhibits the bacterial metallo-beta-lactamase enzyme CphA. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 1995; **39**(7): 1629-31.
78. Koller M, Brom J, Raulf M, König W. Cilastatin (MK 0791) is a potent and specific inhibitor of the renal leukotriene D₄-dipeptidase. *Biochem Biophys Res Commun* 1985; **131**(2): 974-9.
79. Koyner JL, Sher Ali R, Murray PT. Antioxidants. Do they have a place in the prevention or therapy of acute kidney injury? *Nephron Exp Nephrol* 2008; **109**(4): e109-17.
80. Krieger M, Herz J. Structures and functions of multiligand lipoprotein receptors: macrophage scavenger receptors and LDL receptor-related protein (LRP). *Annu Rev Biochem* 1994; **63**: 601-37.
81. Kropp H, Sundelof JG, Hajdu R, Kahan FM. Metabolism of thienamycin and related carbapenem antibiotics by the renal dipeptidase, dehydropeptidase. *Antimicrob Agents Chemother* 1982; **22**(1): 62-70.
82. Kusama M, Yamamoto K, Yamada H, Kotaki H, Sato H, Iga T. Effect of cilastatin on renal handling of vancomycin in rats. *J Pharm Sci* 1998; **87**(9): 1173-6.
83. Launay-Vacher V, Izzedine H, Karie S, Hulot JS, Baumelou A, Deray G. Renal tubular drug transporters. *Nephron Physiol* 2006; **103**(3): p97-106.
84. Laurent G, Kishore BK, Tulkens PM. Aminoglycoside-induced renal phospholipidosis and nephrotoxicity. *Biochemical pharmacology* 1990; **40**(11): 2383-92.
85. Laurent G, Maldague P, Carlier MB, Tulkens PM. Increased renal DNA synthesis in vivo after administration of low doses of gentamicin to rats. *Antimicrob Agents Chemother* 1983; **24**(4): 586-93.

86. Laurent G, Carlier MB, Rollman B, Van Hoof F, Tulkens P. Mechanism of aminoglycoside-induced lysosomal phospholipidosis: in vitro and in vivo studies with gentamicin and amikacin. *Biochem Pharmacol* 1982; **31**(23): 3861-70.
87. Lazaro A, Humanes B, Jado JC, Tejedor A. The authors reply. *Kidney Int* 2013; **83**(6): 1201-2.
88. Lazaro A, Camaño, S., Humanes, B. & Tejedor, A. Novel strategies in drug-induced acute kidney injury. In: *Gallelli L (ed) Pharmacology Intech, Rijeka, Croatia* 2012: 381-96.
89. Lee KE, Kim EY, Kim CS, et al. Macrophage-stimulating protein attenuates gentamicin-induced inflammation and apoptosis in human renal proximal tubular epithelial cells. *Biochemical and biophysical research communications* 2013; **434**(3): 527-33.
90. Leehey DJ, Braun BI, Tholl DA, et al. Can pharmacokinetic dosing decrease nephrotoxicity associated with aminoglycoside therapy. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 1993; **4**(1): 81-90.
91. Leroux MR, Melki R, Gordon B, Batelier G, Candido EP. Structure-function studies on small heat shock protein oligomeric assembly and interaction with unfolded polypeptides. *J Biol Chem* 1997; **272**(39): 24646-56.
92. Leroux MR, Ma BJ, Batelier G, Melki R, Candido EP. Unique structural features of a novel class of small heat shock proteins. *J Biol Chem* 1997; **272**(19): 12847-53.
93. Levi M, Cronin RE. Early selective effects of gentamicin on renal brush-border membrane Na-Pi cotransport and Na-H exchange. *The American journal of physiology* 1990; **258**(5 Pt 2): F1379-87.
94. Li J, Li QX, Xie XF, Ao Y, Tie CR, Song RJ. Differential roles of dihydropyridine calcium antagonist nifedipine, nitrendipine and amlodipine on gentamicin-induced renal tubular toxicity in rats. *Eur J Pharmacol* 2009; **620**(1-3): 97-104.
95. Lipsky JJ, Cheng L, Sacktor B, Lietman PS. Gentamicin uptake by renal tubule brush border membrane vesicles. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 1980; **215**(2): 390-3.
96. Lopez-Novoa JM, Quiros Y, Vicente L, Morales AI, Lopez-Hernandez FJ. New insights into the mechanism of aminoglycoside nephrotoxicity: an integrative point of view. *Kidney Int* 2011; **79**(1): 33-45.
97. Maeno E, Ishizaki Y, Kanaseki T, Hazama A, Okada Y. Normotonic cell shrinkage because of disordered volume regulation is an early prerequisite to apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; **97**(17): 9487-92.
98. Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol* 1995; **146**(1): 3-15.
99. Markewitz A, Hammer C, Pfeiffer M, et al. Reduction of cyclosporine-induced nephrotoxicity by cilastatin following clinical heart transplantation. *Transplantation* 1994; **57**(6): 865-70.

100. Mela-Riker LM, Widener LL, Houghton DC, Bennett WM. Renal mitochondrial integrity during continuous gentamicin treatment. *Biochemical pharmacology* 1986; **35**(6): 979-84.
101. Millan J, de Marco MC, Qaidi M, Batista A, Martin-Belmonte F, Alonso MA. Isolation of lipid raft-associated proteolipids. *Methods Mol Biol* 2003; **228**: 223-30.
102. Miyazaki T, Sagawa R, Honma T, et al. 73-kDa molecular chaperone HSP73 is a direct target of antibiotic gentamicin. *J Biol Chem* 2004; **279**(17): 17295-300.
103. Morales AI, Arévalo M., Pérez-Barriocanal F. Mecanismos implicados en la nefrotoxicidad producida por aminoglucósidos. *Nefrología* 2000; **XX**: Número 5.
104. Morandat S, Bortolato M, Roux B. Cholesterol-dependent insertion of glycosylphosphatidylinositol-anchored enzyme. *Biochim Biophys Acta* 2002; **1564**(2): 473-78.
105. Myrdal SE, Johnson KC, Steyger PS. Cytoplasmic and intra-nuclear binding of gentamicin does not require endocytosis. *Hear Res* 2005; **204**(1-2): 156-69.
106. Nagai J, Takano M. Molecular aspects of renal handling of aminoglycosides and strategies for preventing the nephrotoxicity. *Drug metabolism and pharmacokinetics* 2004; **19**(3): 159-70.
107. Nagai J, Katsube T, Murakami T, Takano M. Effect of gentamicin on pharmacokinetics of lysozyme in rats: interaction between megalin substrates in the kidney. *J Pharm Pharmacol* 2002; **54**(11): 1491-6.
108. Nagai J, Komeda T, Yumoto R, Takano M. Effect of protamine on the accumulation of gentamicin in opossum kidney epithelial cells. *The Journal of pharmacy and pharmacology* 2013; **65**(3): 441-6.
109. Nagai J, Saito M, Adachi Y, Yumoto R, Takano M. Inhibition of gentamicin binding to rat renal brush-border membrane by megalin ligands and basic peptides. *J Control Release* 2006; **112**(1): 43-50.
110. Negrette-Guzman M, Huerta-Yepez S, Medina-Campos ON, et al. Sulforaphane attenuates gentamicin-induced nephrotoxicity: role of mitochondrial protection. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM* 2013; **2013**: 135314.
111. Ngaha EO, Ogunleye IO. Studies on gentamicin-induced labilization of rat kidney lysosomes in vitro. Possible protection by selenium. *Biochem Pharmacol* 1983; **32**(18): 2659-64.
112. Nitanaï Y, Satow Y, Adachi H, Tsujimoto M. Crystal structure of human renal dipeptidase involved in beta-lactam hydrolysis. *J Mol Biol* 2002; **321**(2): 177-84.
113. Nonclercq D, Wrona S, Toubreau G, et al. Tubular injury and regeneration in the rat kidney following acute exposure to gentamicin: a time-course study. *Ren Fail* 1992; **14**(4): 507-21.
114. Norrby SR, Alestig K, Bjornegard B, et al. Urinary recovery of N-formimidoyl thienamycin (MK0787) as affected by coadministration of N-formimidoyl

- thienamycin dehydropeptidase inhibitors. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 1983; **23**(2): 300-7.
115. Ortega A, Ramila D, Izquierdo A, et al. Role of the renin-angiotensin system on the parathyroid hormone-related protein overexpression induced by nephrotoxic acute renal failure in the rat. *J Am Soc Nephrol* 2005; **16**(4): 939-49.
116. Ortiz A, Lorz C, Justo P, Catalan MP, Egido J. Contribution of apoptotic cell death to renal injury. *Journal of cellular and molecular medicine* 2001; **5**(1): 18-32.
117. Ozturk HS, Kavutcu M, Kacmaz M, Canbolat O, Durak I. The effects of gentamicin on the activities of glutathione peroxidase and superoxide dismutase enzymes and malondialdehyde levels in heart tissues of guinea pigs. *Curr Med Res Opin* 1997; **14**(1): 47-52.
118. Pancoast SJ. Aminoglycoside antibiotics in clinical use. *The Medical clinics of North America* 1988; **72**(3): 581-612.
119. Pastoriza-Munoz E, Bowman RL, Kaloyanides GJ. Renal tubular transport of gentamicin in the rat. *Kidney Int* 1979; **16**(4): 440-50.
120. Pattyn VM, Verpooten GA, Giuliano RA, Zheng F, De Broe ME. Effect of hyperfiltration, proteinuria and diabetes mellitus on the uptake kinetics of gentamicin in the kidney cortex of rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1988; **244**(2): 694-8.
121. Pedraza-Chaverri J, Gonzalez-Orozco AE, Maldonado PD, Barrera D, Medina-Campos ON, Hernandez-Pando R. Diallyl disulfide ameliorates gentamicin-induced oxidative stress and nephropathy in rats. *European journal of pharmacology* 2003; **473**(1): 71-8.
122. Pedraza-Chaverri J, Maldonado PD, Medina-Campos ON, et al. Garlic ameliorates gentamicin nephrotoxicity: relation to antioxidant enzymes. *Free radical biology & medicine* 2000; **29**(7): 602-11.
123. Perez M, Castilla M, Torres AM, Lazaro JA, Sarmiento E, Tejedor A. Inhibition of brush border dipeptidase with cilastatin reduces toxic accumulation of cyclosporin A in kidney proximal tubule epithelial cells. *Nephrol Dial Transplant* 2004; **19**(10): 2445-55.
124. Pike MC, Snyderman R. Leukocyte chemoattractant receptors. *Methods Enzymol* 1988; **162**: 236-45.
125. Polek TC, Talpaz M, Darnay BG, Spivak-Kroizman T. TWEAK mediates signal transduction and differentiation of RAW264.7 cells in the absence of Fn14/TweakR. Evidence for a second TWEAK receptor. *J Biol Chem* 2003; **278**(34): 32317-23.
126. Prieto M, Rivas JV, Lopez Novoa JM, Perez-Barriocanal F. [TGF-beta: synthesis and mechanism of action]. *Nefrologia* 2002; **22**(2): 135-43.
127. Quiros Y, Vicente-Vicente L, Morales AI, Lopez-Novoa JM, Lopez-Hernandez FJ. An integrative overview on the mechanisms underlying the renal tubular cytotoxicity of gentamicin. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 2011; **119**(2): 245-56.

128. Raff MC. Social controls on cell survival and cell death. *Nature* 1992; **356**(6368): 397-400.
129. Rafieian-Kopaei M, Baradaran A, Merrikhi A, Nematbakhsh M, Madihi Y, Nasri H. Efficacy of Co-administration of Garlic Extract and Metformin for Prevention of Gentamicin-Renal Toxicity in Wistar Rats: A Biochemical Study. *International journal of preventive medicine* 2013; **4**(3): 258-64.
130. Rivas-Cabañero L, Rodriguez-Barbero A, Eleno N, Lopez-Novoa JM. Nefrotoxicidad: Análisis de mecanismos básicos. *Nefrología* 1995; **15**: Suplemento 1.
131. Rodriguez Iturbe BF, L. . Apoptosis en Enfermedades Renales. *Nefrología* 2011; **XVII**: 457-66.
132. Rodriguez-Barbero A, Bosque E, Rivas-Cabaero L, Arevalo M, Lopez-Novoa JM. Effect of platelet activating factor antagonist treatment on gentamicin nephrotoxicity. *Mediators of inflammation* 1992; **1**(1): 23-6.
133. Rodriguez-Puyol D, Lamas S, Olivera A, et al. Actions of cyclosporin A on cultured rat mesangial cells. *Kidney Int* 1989; **35**(2): 632-7.
134. Rybak MJ, Albrecht LM, Berman JR, Warbasse LH, Svensson CK. Vancomycin pharmacokinetics in burn patients and intravenous drug abusers. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; **34**(5): 792-5.
135. Sabbisetti VS, Ito K, Wang C, Yang L, Mefferd SC, Bonventre JV. Novel assays for detection of urinary KIM-1 in mouse models of kidney injury. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 2013; **131**(1): 13-25.
136. Sachs DH, Leight G, Cone J, Schwarz S, Stuart L, Rosenberg S. Transplantation in miniature swine. I. Fixation of the major histocompatibility complex. *Transplantation* 1976; **22**(6): 559-67.
137. Sahu BD, Tatireddy S, Koneru M, et al. Naringin ameliorates gentamicin-induced nephrotoxicity and associated mitochondrial dysfunction, apoptosis and inflammation in rats: Possible mechanism of nephroprotection. *Toxicology and applied pharmacology* 2014; **277**(1): 8-20.
138. Saito Y, Nishio K, Ogawa Y, et al. Turning point in apoptosis/necrosis induced by hydrogen peroxide. *Free Radic Res* 2006; **40**(6): 619-30.
139. Sanchez-Lopez E, Rodrigues Diez R, Rodriguez Vita J, et al. [Connective tissue growth factor (CTGF): a key factor in the onset and progression of kidney damage]. *Nefrologia* 2009; **29**(5): 382-91.
140. Sandoval RM, Molitoris BA. Gentamicin traffics retrograde through the secretory pathway and is released in the cytosol via the endoplasmic reticulum. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004; **286**(4): F617-24.
141. Sastrasin M, Knauss TC, Weinberg JM, Humes HD. Identification of the aminoglycoside binding site in rat renal brush border membranes. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 1982; **222**(2): 350-8.

142. Schmid H, Boucherot A, Yasuda Y, et al. Modular activation of nuclear factor-kappaB transcriptional programs in human diabetic nephropathy. *Diabetes* 2006; **55**(11): 2993-3003.
143. Schmitz C, Hilpert J, Jacobsen C, et al. Megalin deficiency offers protection from renal aminoglycoside accumulation. *J Biol Chem* 2002; **277**(1): 618-22.
144. Schwartz D, Blum M, Peer G, et al. Role of nitric oxide (EDRF) in radiocontrast acute renal failure in rats. *Am J Physiol* 1994; **267**(3 Pt 2): F374-9.
145. Servais H, Jossin Y, Van Bambeke F, Tulkens PM, Mingeot-Leclercq MP. Gentamicin causes apoptosis at low concentrations in renal LLC-PK1 cells subjected to electroporation. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; **50**(4): 1213-21.
146. Servais H, Ortiz A, Devuyst O, Denamur S, Tulkens PM, Mingeot-Leclercq MP. Renal cell apoptosis induced by nephrotoxic drugs: cellular and molecular mechanisms and potential approaches to modulation. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* 2008; **13**(1): 11-32.
147. Servais H, Van Der Smissen P, Thirion G, et al. Gentamicin-induced apoptosis in LLC-PK1 cells: involvement of lysosomes and mitochondria. *Toxicology and applied pharmacology* 2005; **206**(3): 321-33.
148. Shi Y. Caspase activation, inhibition, and reactivation: a mechanistic view. *Protein Sci* 2004; **13**(8): 1979-87.
149. Shibuya H, Kato Y, Saito M, et al. Induction of apoptosis and/or necrosis following exposure to antitumour agents in a melanoma cell line, probably through modulation of Bcl-2 family proteins. *Melanoma Res* 2003; **13**(5): 457-64.
150. Sido B, Hammer C, Mraz W, Krombach F. Nephroprotective effect of imipenem/cilastatin in reducing cyclosporine toxicity. *Transplant Proc* 1987; **19**(1 Pt 2): 1755-8.
151. Silverblatt F. Pathogenesis of nephrotoxicity of cephalosporins and aminoglycosides: a review of current concepts. *Reviews of infectious diseases* 1982; **4 Suppl**: S360-5.
152. Silverblatt FJ, Kuehn C. Autoradiography of gentamicin uptake by the rat proximal tubule cell. *Kidney Int* 1979; **15**(4): 335-45.
153. Simon C, Stille, W., Perea, E. J.,. Aminoglucosidos. *Manual de terapéutica microbiana Ed Salvat* 1987: pp: 178-205.
154. Sorribas V, Halaihel N, Puttaparthi K, et al. Gentamicin causes endocytosis of Na/Pi cotransporter protein (NaPi-2). *Kidney Int* 2001; **59**(3): 1024-36.
155. Standards NCfCL. Methods for determining bactericidal activity of antimicrobials. 1999; **M 26-A**.
156. Steller H. Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science* 1995; **267**(5203): 1445-9.

157. Sue YM, Cheng CF, Chang CC, Chou Y, Chen CH, Juan SH. Antioxidation and anti-inflammation by haem oxygenase-1 contribute to protection by tetramethylpyrazine against gentamicin-induced apoptosis in murine renal tubular cells. *Nephrol Dial Transplant* 2009; **24**(3): 769-77.
158. Takamoto K, Kawada M, Ikeda D, Yoshida M. Apolipoprotein E3 (apoE3) safeguards pig proximal tubular LLC-PK1 cells against reduction in SGLT1 activity induced by gentamicin C. *Biochimica et biophysica acta* 2005; **1722**(3): 247-53.
159. Takeda J, Kinoshita T. GPI-anchor biosynthesis. *Trends Biochem Sci* 1995; **20**(9): 367-71.
160. Takeda M, Narikawa S, Hosoyamada M, Cha SH, Sekine T, Endou H. Characterization of organic anion transport inhibitors using cells stably expressing human organic anion transporters. *Eur J Pharmacol* 2001; **419**(2-3): 113-20.
161. Taye A, Ibrahim BM. Activation of renal haeme oxygenase-1 alleviates gentamicin-induced acute nephrotoxicity in rats. *The Journal of pharmacy and pharmacology* 2013; **65**(7): 995-1004.
162. Tejedor A, Torres AM, Castilla M, Lazaro JA, de Lucas C, Caramelo C. Cilastatin protection against cyclosporin A-induced nephrotoxicity: clinical evidence. *Curr Med Res Opin* 2007; **23**(3): 505-13.
163. Todd JH, Sens DA, Hazen-Martin DJ, Bylander JE, Smyth BJ, Sens MA. Aminoglycoside antibiotics alter the electrogenic transport properties of cultured human proximal tubule cells. *Toxicologic pathology* 1992; **20**(4): 608-16.
164. Toyoguchi T, Nakagawa Y, Watanabe H. [Nephrotoxicity and drug interaction of vancomycin]. *Nihon yakurigaku zasshi Folia pharmacologica Japonica* 1996; **107**(2): 53-66.
165. Toyoguchi T, Takahashi S, Hosoya J, Nakagawa Y, Watanabe H. Nephrotoxicity of vancomycin and drug interaction study with cilastatin in rabbits. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 1997; **41**(9): 1985-90.
166. Tsuruya K, Ninomiya T, Tokumoto M, et al. Direct involvement of the receptor-mediated apoptotic pathways in cisplatin-induced renal tubular cell death. *Kidney Int* 2003; **63**(1): 72-82.
167. Tulkens PM. Nephrotoxicity of aminoglycoside antibiotics. *Toxicol Lett* 1989; **46**(1-3): 107-23.
168. Vaux DL, Korsmeyer SJ. Cell death in development. *Cell* 1999; **96**(2): 245-54.
169. Velasco-Velazquez MA, Maldonado PD, Barrera D, Torres V, Zentella-Dehesa A, Pedraza-Chaverri J. Aged garlic extract induces proliferation and ameliorates gentamicin-induced toxicity in LLC-PK1 cells. *Phytotherapy research : PTR* 2006; **20**(1): 76-8.
170. Verpooten GA, Giuliano RA, Verbist L, Eestermans G, De Broe ME. Once-daily dosing decreases renal accumulation of gentamicin and netilmicin. *Clin Pharmacol Ther* 1989; **45**(1): 22-7.

171. Vural S, Erdem E, Gulec SG, Yildirmak Y, Kebudi R. Imipenem-cilastatin versus piperacillin-tazobactam as monotherapy in febrile neutropenia. *Pediatrics international : official journal of the Japan Pediatric Society* 2010; **52**(2): 262-7.
172. Walker PD, Shah SV. Gentamicin enhanced production of hydrogen peroxide by renal cortical mitochondria. *The American journal of physiology* 1987; **253**(4 Pt 1): C495-9.
173. Walker PD, Shah SV. Evidence suggesting a role for hydroxyl radical in gentamicin-induced acute renal failure in rats. *J Clin Invest* 1988; **81**(2): 334-41.
174. Willnow TE, Nykjaer A, Herz J. Lipoprotein receptors: new roles for ancient proteins. *Nat Cell Biol* 1999; **1**(6): E157-62.
175. Xanthoudakis S, Nicholson DW. Heat-shock proteins as death determinants. *Nat Cell Biol* 2000; **2**(9): E163-5.
176. Yamamoto S, Nakano S, Owari K, et al. Gentamicin inhibits HSP70-assisted protein folding by interfering with substrate recognition. *FEBS letters* 2010; **584**(4): 645-51.
177. Yaman I, Balikci E. Protective effects of nigella sativa against gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Experimental and toxicologic pathology : official journal of the Gesellschaft fur Toxikologische Pathologie* 2010; **62**(2): 183-90.
178. Yanagida C, Ito K, Komiya I, Horie T. Protective effect of fosfomycin on gentamicin-induced lipid peroxidation of rat renal tissue. *Chemico-biological interactions* 2004; **148**(3): 139-47.
179. Yin XM. Bid, a BH3-only multi-functional molecule, is at the cross road of life and death. *Gene* 2006; **369**: 7-19.
180. Zeis PM, Gourgiotis D, Moustaki M, et al. Protective effect of poly I:poly C from gentamicin nephrotoxicity in guinea pigs. *Cytobios* 2001; **106**(412): 139-46.
181. Zou H, Li Y, Liu X, Wang X. An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol Chem* 1999; **274**(17): 11549-56.

X.- ANEXO

Los resultados mostrados en esta Tesis están parcialmente pendientes de publicación en:

- **Jado JC**, Humanes B, Lara JM, Cercenado E, Tejedor A, Lazaro A. "Protective effects of cilastatin on gentamicin-induced acute kidney injury in experimental rat model". *Kidney Int.* 2014 (ENVIADO).
- **Jado JC**, Humanes B, Camano S, Lopez-Parra V, Lara JM, Cercenado E, Tejedor A, Lazaro A. "Cilastatin attenuates gentamicin-induced inflammation and oxidative stress in rats". *Am J Pathol* 2014 (ENVIADO).

Otros artículos publicados o en proceso de publicación durante el desarrollo de esta Tesis:

- Humanes B, **Jado JC**, Lara JM, Cercenado E, Lazaro A, Tejedor A. "Cilastatin protects cisplatin-induced nephrotoxicity by decreasing inflammation and oxidative stress". (EN PREPARACIÓN).
- Lázaro A, Humanes B, **Jado JC**, Tejedor A. "Response to "Cisplatin nephrotoxicity may be sex-related"". *Kidney Int.* Jun; 83 (6): 1201-2 (2013).
- Lledó-García E, Humanes-Sánchez B, Mojena-Sánchez M, **Rodríguez JC**, Hernández-Fernández C, Tejedor-Jorge A, Fernández AL. "Independent cellular effects of cold ischemia and reperfusion: experimental molecular study". *Transplant Proc.* Apr;45(3):1260-3 (2013).

Los resultados de esta Tesis han sido presentados parcialmente en los siguientes congresos:

- 51st ERA-EDTA Congress. Amsterdam (Holanda). 31 Mayo al 3 Junio 2014. "Effects of cilastatin on gentamicin-induced renal damage. In vitro and in vivo evidence". **Jado JC**, Humanes B, López-Parra V., Camaño S., Lara J.M., Cercenado E., Tejedor A., Lázaro A. (COMUNICACIÓN PÓSTER).

Otras presentaciones a congresos durante el desarrollo de esta Tesis:

- 50th ERA-EDTA Congress. Estambul (Turquía), 18 al 21 de Mayo de Mayo de 2013. *“Role of cilastatin against cisplatin-induced nephrotoxicity and inflammation in rats”*. Humanes B., Camaño S., **Jado JC**, Mojena M, Lara JM, Alvarez-Sala L, Tejedor A, Lázaro A. (COMUNICACIÓN PÓSTER).
- 28th Annual European Association of Urology (EAU) Congress Milán (Italia). Marzo de 2013. *“Beneficial effect of a short-period of hypothermic pulsatile machine perfusion of warm ischemic kidneys just before the transplant. Experimental study”*. B. Humanes-Sanchez, A. Lazaro-Fernandez, **J.C. Jado**, M. Mojena-Sanchez, D. Ramirez-Martin, C. Agra, E. Alvarez, J.F. Del Cañizo-Lopez, C. Hernandez-Fernandez, A. Tejedor-Jorge, E. Lledo-Garcia. Publicado en: *European Urology Supplements*: 12 (issue 1) e606-e607, March 2013.
- 28th Annual European Association of Urology (EAU) Congress Milán (Italia). Marzo de 2013. *“Experimental evaluation of Renal oxygen consumption and antioxidant activity in the post-transplant period of kidneys with initial warm ischemia”*. A. Lazaro-Fernandez, B. Humanes-Sanchez, M. Mojena, **J.C. Jado**, D. Ramirez-Martin, C. Agra, C. Hernandez-Fernandez, A. Tejedor-Jorge, E. Lledo-Garcia. Publicado en: *European Urology Supplements*: 12 (issue 1) e607-e608, March 2013.
- II Jornada de Investigación e Innovación del Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón. Madrid (España). 21 de Febrero de 2013. *“Cilastatina protege el riñón del daño tóxico generado por cisplatino”*. Humanes B, Lázaro A, Camaño S, **Jado JC**, Lázaro JA, Mojena M, Lara JM, Tejedor A. (COMUNICACIÓN PUBLICACIÓN).
- II Jornada de Investigación e Innovación del Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón. Madrid (España). 21 de Febrero de 2013. *“Efecto de la cilastatina sobre la muerte celular por vancomicina en células proximales renales”*. Lázaro A, Camaño S, López-Parra V, Humanes B, **Jado JC**, Cercenado E, Tejedor A. (COMUNICACIÓN PÓSTER).

- XXVI Reunión Nacional de Trasplante. Asociación Española de Urología. La Laguna (Tenerife). Febrero de 2013. *“Efecto beneficioso de período corto de perfusión hipotérmica en máquina antes del trasplante en injertos con isquemia normotérmica inicial”*. Humanes-Sanchez B., Lazaro-Fernandez A., **Jado J.C.**, Mojena-Sanchez M., Del Pozo G., Agra C., Del Cañizo-Lopez J. F., Hernandez-Fernandez C., Tejedor-Jorge A., Lledo-Garcia E.
- ASTS 13th Annual State of the Art Winter Symposium 2013. Miami (Florida, Estados Unidos). Enero-Febrero de 2013. *“Experimental Evaluation of the Molecular Consequences of Warm Ischemia and Cold Storage in the Renal Graft. Modulatory Effects of Short Periods of Machine Perfusion”*. Enrique Lledo-Garcia, Blanca Humanes-Sanchez, Alberto Tejedor-Jorge, Marina Mojena-Sanchez, **Juan Carlos Jado-Rodriguez**, Carlos Hernandez-Fernandez, Juan Francisco Del Canizo-Lopez, Alberto Lazaro-Fernandez. Publicado en: *American Journal of transplantation* 2013: vol. 13: pag 75-76.